

Method for controlling proliferation and differentiation of cells encapsulated within bioartificial organs

| | | |
|---------------------|--|--------------------|
| Patent number: | JP10506266 (T) | Also published as: |
| Publication date: | 1998-06-23 | US5795790 (A) |
| Inventor(s): | SCHINSTINE MALCOLM [US]; SHOICHET MOLLY S [US]; GENTILE FRANK T [US]; HAMMANG JOSEPH P [US]; HOLLAND LAURA M [US]; CAIN BRIAN M [US]; DOHERTY EDWARD J [US]; WINN SHELLEY R [US]; AEBISCHER PATRICK [CH] | US6392118 (B1) |
| Applicant(s): | CYTOTHERAPEUTICS INC [US] | US5858747 (A) |
| Classification: | | US5776747 (A) |
| - International: | <i>A01K67/027; A61L27/00; A61L27/18; A61L27/22; A61L27/38; C07K14/82; C12N15/09; C12N15/12; C12N5/00; C12N5/10; A61K48/00; (IPC1-7): A01K67/027; C12N15/09; C12N5/10</i> | US5833979 (A) |
| - european: | A61L27/22R; A61L27/38; C07K14/82; C12N5/00S; A61L27/18 | |
| Application number: | JP19950505271T 19950720 | |
| Priority number(s): | WO1995US09281 19950720; US19940279773 19940720; US19950432698 19950509 | |

Abstract not available for JP 10506266 (T)

Abstract of correspondent: US 5795790 (A)

Methods and compositions are provided for controlling cell distribution within a bioartificial organ by exposing the cells to a treatment that inhibits cell proliferation, promotes cell differentiation, or affects cell attachment to a growth surface within the bioartificial organ. Such treatments include (1) genetically manipulating cells, (2) exposing the cells to a proliferation-inhibiting compound or a differentiation-inducing compound or removing the cells from exposure to a proliferation-stimulating compound or a differentiation-inhibiting compound; exposing the cells to irradiation, and (3) modifying a growth surface of the bioartificial organ with extracellular matrix molecules, molecules affecting cell proliferation or adhesion, or an inert scaffold, or a combination thereof. These treatments may be used in combination. In a preferred treatment, cells are exposed to and then removed from exposure to a proliferation-stimulating and differentiation inhibiting compound prior to encapsulation of the cells in a semipermeable biocompatible jacket to form a bioartificial organ. Upon *in vivo* implantation of the bioartificial organ in a host, cellular proliferation is inhibited and cellular differentiation is promoted.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506266

(43) 公表日 平成10年(1998)6月23日

(51) Int.Cl.^a
C 12 N 15/09
A 01 K 67/027
C 12 N 5/10

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
A 01 K 67/027
C 12 N 5/00

ZNAA
B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)

(21) 出願番号 特願平8-505271
(22) 出願日 平成7年(1995)7月20日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)1月20日
(86) 國際出願番号 PCT/US95/09281
(87) 國際公開番号 WO96/02646
(87) 國際公開日 平成8年(1996)2月1日
(31) 優先権主張番号 08/279,773
(32) 優先日 1994年7月20日
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 08/432,698
(32) 優先日 1995年5月9日
(33) 優先権主張国 米国(US)

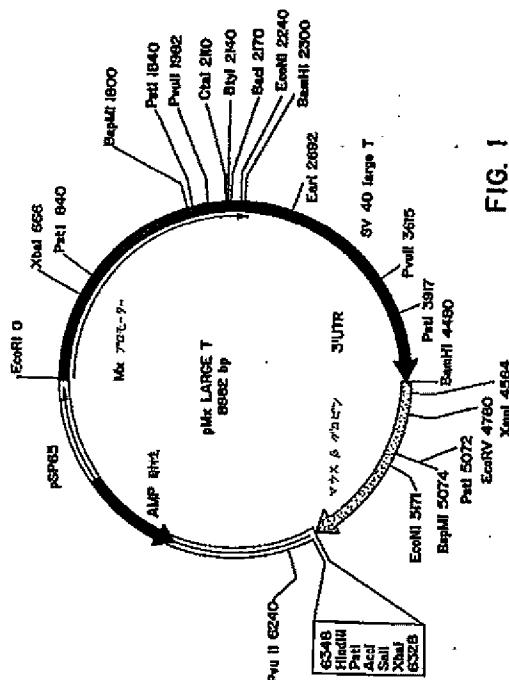
(71) 出願人 サイトセラピューティクス、 インコーポ
レイテッド
アメリカ合衆国 ロードアイランド
02906, プロビデンス, リッチモンド
スクエア 2
(72) 発明者 シンスタイン, マルコム
アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19020,
ペン セーラム, オリオール ドライ
ブ ノース 116
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体人工臓器内にカプセル化された細胞の増殖制御

(57) 【要約】

本発明は、細胞の増殖阻害、細胞の分化促進、あるいは生体人工臓器内の増殖表面への細胞接着に影響を与える処理に細胞を曝露することによって、生体人工臓器内の細胞分布を制御する方法および組成物に関する。そのような処理は、(1)細胞の遺伝子操作を行うこと、(2)細胞を増殖阻害化合物または分化誘導化合物に曝露すること、あるいは細胞を増殖刺激化合物または分化阻害化合物の曝露から取り出すこと；細胞を照射に曝露すること、および(3)ECM分子、細胞増殖または接着に影響を与える分子、または不活性な骨格、あるいはそれらの組み合わせによるBAOの増殖表面を修飾することを包括する。これらの処理は組み合わせて使用され得る。



【特許請求の範囲】

1. 生体人工臓器内の細胞の分布を制御する方法であって、細胞増殖を阻害するか、または細胞分化を促進する処置に細胞を曝露する工程（ここで該処置は、宿主へのインビオでの移植に効果的である）を包含する、方法。
2. 前記処置が、調節性プロモーターに作動可能に連結された増殖促進遺伝子で細胞を形質転換し、それにより、増殖促進遺伝子の発現が宿主へのインビオでの移植において阻害され得る工程を包含する、請求項1に記載の方法。
3. 前記増殖促進遺伝子がガン遺伝子である、請求項2に記載の方法。
4. 前記ガン遺伝子が、c-myc、v-mos、v-Ha-ras、SV40初期領域およびE1-Aからなる群より選択される、請求項3に記載の方法。
5. 前記調節性プロモーターが、テトラサイクリン反応性プロモーター、インターフェロン反応性プロモーター、グルココルチコイド反応性プロモーター、およびレトロウイルス末端反復配列プロモーターからなる群より選択される、請求項2に記載の方法。
6. 前記プロモーターがMx1プロモーターであり、そして前記増殖促進遺伝子がSV40初期領域である、請求項5に記載の方法。
7. 前記処置が、調節性プロモーターに作動可能に連結された増殖抑制遺伝子で細胞を形質転換し、それにより、増殖抑制遺伝子の発現が宿主へのインビオでの移植で起こり得るが、インビトロでは阻害され得る工程を包含する、請求項1に記載の方法。
8. 前記増殖抑制遺伝子が、p53遺伝子およびRB遺伝子からなる群より選択されるガン抑制遺伝子である、請求項7に記載の方法。
9. 前記処置が、調節性プロモーターに作動可能に連結された分化誘導遺伝子で細胞を形質転換し、それにより、分化誘導遺伝子の発現が宿主へのインビオでの移植で起こり得るが、インビトロでは阻害され得る工程を包含する、請求項1に記載の方法。
10. 前記分化誘導遺伝子が高速移動群染色体タンパク質14である、請求項9に記載の方法。

11. 前記処置が、増殖阻害化合物または分化誘導化合物に細胞を曝露する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

12. 前記増殖阻害化合物または分化誘導化合物が、ホルボールエステル、ヘパリン、TGF- β 、アスコルビン酸、マイトマイシン、BrdU、PGE₁、dbcAMP、Ara-C、ニコチニアミドおよびSGPからなる群より選択される、請求項11に記載の方法。

13. 前記処置が、増殖刺激化合物または分化阻害化合物への曝露から細胞を取り出す工程を包含する、請求項1に記載の方法。

14. 前記増殖刺激化合物または分化阻害化合物がEGF、TGF- α およびアンフィレグリンからなる群より選択され、そして前記細胞が神経幹細胞である、請求項13に記載の方法。

15. 前記増殖刺激化合物または分化阻害化合物が、成長因子のFGFファミリーのメンバーの混合物、および少なくとも成長因子のCNTFまたはNGFファミリーの1つのメンバーであり、そして前記細胞が神経幹細胞である、請求項13に記載の方法。

16. 前記増殖刺激化合物または分化阻害化合物が多系統性成長因子であり、そして前記細胞が造血幹細胞である、請求項13に記載の方法。

17. 生体人工臓器内の細胞の分布を制御する方法であって、細胞増殖を阻害するか、または細胞分化を促進する処置に生体人工臓器内の少なくとも1つの増殖表面を曝露する工程であって、該処置が宿主へのインビボでの移植に効果的である工程を包含する、方法。

18. 前記処置が、少なくとも1つの有効量の細胞外マトリックス分子で増殖表面をコートする工程を包含する、請求項17に記載の方法。

19. 前記細胞外マトリックス分子でコートされた前記増殖表面が、前記生体人工臓器の内部管表面を含む、請求項18に記載の方法。

20. 前記細胞外マトリックス分子でコートされた前記増殖表面が、前記生体人工臓器内にカプセル化されたマイクロキャリアを含む、請求項18に記載の方法。

21. 前記処置が、前記生体人工臓器内のヒドロゲルマトリックス中に細胞を取り付ける工程であって、該マトリックスが増殖を阻害するかまたは分化を誘導するペプチドあるいはペプチド配列で誘導体化される工程を包含する、請求項1に記載の方法。

22. 前記ヒドロゲルマトリックスがRGD含有配列(ArgGlyAsp;配列番号2のAA₂-AA₄)、YIGSR含有配列(TyrIleGlySerArg;配列番号1のAA₅-AA₉)、およびIKVAV含有配列(IleLysValAlaVal;配列番号3のAA₁₁-AA₁₅)からなる群より選択されるペプチド配列で誘導体化されるアガロースからなる、請求項21に記載の方法。

23. 前記マイクロキャリアが、請求項21～22のいずれか1項に記載のヒドロゲルマトリックス中に懸濁される、請求項20に記載の方法。

24. 生体人工臓器内の細胞の分布を制御する方法であって、生体人工臓器への細胞付着を促進する処置に生体人工臓器内の少なくとも1つの増殖表面を曝露する工程を包含する、方法。

25. 前記処置が、前記増殖表面上で化合物を誘導体化するかまたは吸収する工程を包含し、該化合物が、ポリ(d-リジン)、RGD含有配列(ArgGlyAsp;配列番号2のAA₂-AA₄)、YIGSR含有配列(TyrIleGlySerArg;配列番号1のAA₅-AA₉)、およびIKVAV含有配列(IleLysValAlaVal;配列番号3のAA₁₁-AA₁₅)からなる群より選択される、請求項24に記載の方法。

26. 前記処置が前記生体人工臓器内に不活性の骨格を形成する工程を包含する、請求項24に記載の方法。

27. 前記不活性な骨格が、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)およびポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート-コ-メチルメタクリレート)からなる群より選択される化合物から形成される、請求項26に記載の方法。

28. 生体人工臓器内の細胞の分布を制御する方法であって、生体人工臓器への細胞付着を阻害する処置に生体人工臓器内の少なくとも1つの増殖表面を曝露する工程を包含する、方法。

29. 前記処置が、前記増殖表面上にPEO-PDMSを誘導体化するかまたは吸収する

工程を包含する、請求項28に記載の方法。

30. 前記処置が、増殖阻害線量の紫外線に細胞を曝露する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

31. (a) 生体適合性透過選択性被覆物；および

(b) 生存細胞のコアを含む生体人工臓器であって、ここで、該細胞を請求項1～30のいずれか1項に記載の処置に曝露し、それにより、該生体人工臓器内の該細胞分布を宿主へのインピボでの移植で制御し得る、生体人工臓器。

32. (a) 発現時に細胞分裂を誘導することが可能な増殖促進遺伝子、(b) 前記増殖促進遺伝子に作動可能に連結されたMx-1プロモーターを含む、組換えDNA分子で形質転換された細胞であって、ここで、該細胞が、増殖促進遺伝子の発現を引き起こすのに十分な量のインターフェロンへの曝露により増殖を誘導され得る、細胞。

33. 前記増殖促進遺伝子が、SV40ラージT抗原である、請求項32に記載の細胞。

34. 前記細胞が、神経幹細胞由来である、請求項32に記載の細胞。

35. 前記細胞が、生物学的活性分子を分泌する、請求項32に記載の細胞。

36. 前記細胞が、前記生物学的活性分子をコードする遺伝子を含有する発現ベクターで遺伝学的に形質転換される、請求項35に記載の細胞。

37. 前記生物学的活性分子が、神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン、成長因子、栄養因子、リンホカイン、血管形成因子、抗体、血液凝固因子、および酵素からなる群より選択される、請求項35または36に記載の細胞。

38. 組換えDNA分子を用いて形質転換されたトランスジェニック哺乳動物であって、

a) 発現時に細胞分裂を誘導することが可能な増殖促進遺伝子、
b) 該増殖促進遺伝子に作動可能に連結されたMx-1プロモーター
を包含する、トランスジェニック哺乳動物。

39. 前記増殖促進遺伝子が、SV40ラージT抗原である、請求項38に記載のト

ランスジェニック哺乳動物。

40. 請求項38に記載のランスジェニック哺乳動物の子孫。

41. 請求項38または40のいずれかに記載のランスジェニック哺乳動物から単離された細胞。

42. 前記細胞が、神経幹細胞である、請求項41に記載の細胞。

43. 条件付きで不死化した細胞を作製する方法であって：

a) 発現時に細胞分裂を誘導することが可能な増殖促進遺伝子、および該増殖促進遺伝子に作動可能に連結されたMx-1プロモーターを含有する組換えDNA分子で細胞を形質転換し、それにより、該形質転換細胞が、該増殖促進遺伝子の発現を引き起こすのに十分な量のインターフェロンへの曝露により増殖を誘導され得る工程、および

b) 該形質転換細胞を培養する工程
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

生体人工臓器内にカプセル化された細胞の増殖制御

発明の分野

本発明は生体人工臓器(bioartificial organ)内にカプセル化された細胞の増殖を制御するための方法および組成物に関するものである。

発明の背景

生体人工臓器「BAO」は、生細胞を含有し、宿主へ必要とされる代謝機能を供給するよう設計されたデバイス(device)である。

BAOにカプセル化された細胞は1つ以上の生物学的活性分子を宿主に供給し、その分子は多くの臨床症状、欠陥、および疾病状態を予防あるいは治療するのに使用され得る。

例えば、インシュリン分泌細胞を含有するBAOは糖尿病を治療するのに使用され得る。同様に、上皮小体機能低下症および貧血のような他の疾病が、副甲状腺ホルモンおよびエリスロポエチンをそれぞれ分泌する細胞を用いることによって治療され得る。

生体人工臓器は、また、ハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病、および後天性免疫不全症候群関連痴呆のような神経変性症状の治療および予防用のために、生物学的活性分子を供給するのにも使用され得る。さらに、BAOによって、リンホカインそしてサイトカインが宿主の免疫系を調節するために、供給され得る。生体人工臓器によって供給され得る他の生物学的活性分子には、カテコールアミン、エンドルフィン、エンケファリン、および疼痛を治療するのに有用な他のオピオイドあるいは非オピオイドペプチドが含まれる。また酵素的欠陥がBAOを使用することにより治療され得る。あるいは、生物学的活性分子は、宿主から有害な分子を除去あるいは排泄し得る。例えば、BAOは宿主から、コレステロールを「捕捉する」のに使用され得る生物学的活性分子を産生する細胞を包含し得る。

様々な「マクロカプセル」BAOが公知である。例えば、Aebischer(米国特許第5,158,881号)、Dionneら(WO 92/03327)、Mandelら(WO 91/00119)、Aebischer(WO

93/00128)を参照のこと。BAOはまた、血管外拡散チャンバ、血管内拡散チャンバ、血管内限外沪過チャンバ、およびマイクロカプセルを包含する。例えば、Limら(Science 210:908~910(1980))；Sun,A.M.ら(Methods in Enzymology 137:575~579(1988))；Dunleavyら(WO 93/03901)およびChickら(米国特許第5,002,661号)を参照。

BAO内にカプセル化された細胞は必要な代謝的機能を供給するので、それらの細胞はその機能を発揮する生物学的活性分子を最適に供給することが望ましい。代表的には、それらは所望の生物学的活性分子を最適に产生し得るため、BAO内の使用には、分裂中の細胞よりも、分化した非分裂細胞が好まれ得る。例えば、多くの分化した非分裂細胞は、所望の治療タンパク質を分裂細胞よりも多量に产生する。何故なら、分化特異的遺伝子の発現および細胞分裂は拮抗的プロセスであると考えられるからである。Woltheim、「インシュリン分泌β細胞株の樹立と培養」(Methods in Enzymology, 192, 223~235頁(1990))。細胞の複製能は細胞分化とともに低下する。多くの場合、増殖と分化とは互いに排反的なものである。Gonos,「細胞の不死化と分化におけるガン遺伝子」(13, Anticancer Research, 1117頁(1993))。

分化した組織の使用は有利である。何故なら、BAOへの取り込みに所望される組織の機能的特性は、インビオで分化した組織の特性によって規定されることが多いからである。分化した非分裂細胞を使用するのに別の有利な点は、BAO内の細胞数が比較的一定のままであることである。これはまた、レシピエントの宿主に対して、より予想可能な結果および安定した用量をもたらす。さらに、分化した細胞は、生物学的活性分子を分泌する1つ以上のタイプの細胞をカプセル化したBAOでの使用に、より適している。そのようなBAOにおいて、分裂細胞が用いられると、異なるタイプの細胞が異なる速度で増殖し得、それは1つのタイプの細胞の増殖過多をまねく。分化した非分裂細胞を用いることで、共に作用する2つ以上のタイプの細胞の相対的比率が容易に制御され得る。

分化した細胞を使用することは、多数の場合有利ではあるが、哺乳動物から直接分離した分化した細胞の利用に関しては様々な問題が存在する。

第1に、分離した組織は汚染している可能性があり、病原体フリーであることを確かめるために、各動物から取り出した組織を費用と時間のかかる検査に供する必要があり得ることである。

第2に、組織が、分離の過程で機械的あるいは酵素的分離手順を使用するためには、損傷し得ることである。機械的処理法は必ずしも容易に標準化されではおらず、その結果、分離法には様々な変法が存在する。

第3に、分離の間に、組織損傷の原因となる虚血が起こり得る。

第4に、再現性のある収率を得ることは、組織のドナーの多様性のために困難であり得る。例えば、供給源の動物の齢、性、健康状態、ホルモンの状態が、目的の組織の収率および質に影響し得る。

第5に、BAO用に計画された要求量に見合うだけの、供給源の組織が時々十分でないことがある。これは、例えば、供給源の組織が小さなサイズの臓器由来の場合、あるいは組織の最大必要量が高い場合である。分離した組織の供給源がひとつの場合、しばしばドナー組織の深刻な不足が生じる。

第6に、BAOにおいて用いられる細胞を遺伝的に改変することが望ましい場合がある。今までのところ、非分裂組織をインビトロで遺伝的に改変することは困難とされ、改変細胞の収量、および特性は不安定であり得る。このように、上記の問題のため、分化した非分裂細胞の使用は望ましい一方で、BAO中にカプセル化するための、分化した非分裂細胞の產生および維持のための方法が求められている。

このような問題のため、分裂細胞および細胞株は、必要とされる生物学的機能を供給するためのBAO内への使用に好まれている。分裂細胞を用いる1つの最も重要な利点は、そのような細胞はインビトロで多数増殖され得、病原体についてスクリーニングされそして貯蔵され得ることである。このことはより低い产生コストのためにほとんど無制限の組織の供給を可能とする。細胞の選別あるいはクローニングのような選択スキームが、改良された特性を有する亜集団を発生させるために細胞バンクに適用され得る。さらに、分裂細胞および細胞株は、分化した非分裂細胞よりも遺伝子操作をするには、より容易である。異型組換えDNAの

導入能はBAOにカプセル化しようとする細胞の機能または表現型の改変に対して、多くの新規な可能性を可能にする。このことはまた、BAOに対するより多様な治療学的使用を提供する。

しかし、上で議論したように、BAO内で連続的に分裂している細胞のカプセル化の不利な点には、デバイス内の細胞数の調節が弱いことが挙げられ、それは所望の生物学的活性分子の產生の予測可能性を低下させ得る。

ほとんどの場合で、BAO内で細胞増殖を制限あるいは最小限にすることが望ましいとされ得る一方で、他の場合、例えば、BAOが「不良な」環境に移植される場合には、BAO内での細胞数を維持するために、細胞をゆっくりと増殖させることを可能にすることが望まれ得る。

カプセル化した細胞には一般に別の問題も存在する。様々な型の細胞は、その細胞が利用可能な適当なマトリックスが存在しない場合は特に、細胞が互いに接着および密な集塊あるいは集合体を形成する傾向があるような細胞接着特性を有する。そのような細胞集団は、そのコア内に包埋された細胞へは栄養素や酸素が比較的届き難いこと、あるいはコア内での毒物の生成のために、その中心に壊死領域を生じ得る。また壊死組織は、宿主を異種タンパク質で必要以上に満たす過剰の細胞性タンパク質、あるいは、生残細胞に他の有害な因子(例えばマクロファージあるいは免疫応答を誘発する因子)を放出し得る。この問題は、細胞が半透膜性の被覆物を有するBAOにカプセル化される場合、膜を横切る拡散性の圧迫のために、増悪され得る。BAO内では、利用可能な酸素も宿主により供給される栄養物もより少ないことが多い。さらに、BAO内には老廃物が蓄積され得る。

これらの濃厚な細胞塊は、細胞表面接着タンパク質によって媒介される、新たに分散させた細胞あるいは組織の再会合に際して、増殖細胞の密なコロニーをゆっくりと、あるいは迅速に形成し得る。高い代謝活性を有する細胞あるいは組織は、酸素あるいは栄養物の欠乏効果に特に敏感であり得、そして大きな細胞塊の中心に包埋された後すぐに死滅する。通常、密な毛状の層によって支えられている多くの内分泌性の組織がこの挙動を示す；特に、ランゲルハンス島はカプセル化された時に、敏感であるようである。

増殖細胞および分化した非分裂細胞の様々な利点を組み合わせるカプセル化さ

れた細胞の増殖を制御するための方法および組成物が求められている。本発明は、細胞がインビトロで無限に、増殖および拡大され得、本デバイスが所望の様式で作動するように、細胞がBAO内にカプセル化された時に、増殖と分化との間のバランスが制御され得るような方法および組成物を提供する。このように本発明はBAO内の細胞数の制御を可能にし、それゆえ、カプセルの放出レベルの改良された調節を供給し得る。また、本発明は、BAO内の細胞の存在位置を制御することによって、細胞の増殖を制御する方法を提供し、それによってBAO内での望ましくない壊死細胞コアの形成が減少する。また、BAO内での細胞数および細胞の存在位置の制御は、BAO膜および特別のカプセル化された細胞タイプに対する他のデバイスパラメーターの最適化を容易にするという利点も提供する。これは、要求されたデバイス特性が、BAO中で、分裂細胞集団に対するよりも固定細胞集団に対し、より容易に決定されるためである。さらに、生物学的活性分子の長期間の送達が達成され得る。

発明の要旨

本発明は、BAO内に細胞がカプセル化された場合、細胞の分布(すなわち、BAO内での細胞数または細胞の存在位置、あるいはその両方)を制御する方法および組成物を供給することによって、前述の問題に対処する。本発明の方法および組成物は以下のものを包含する。(1)BAO内にカプセル化される細胞の改変のための方法および組成物、ならびに(2)BAO内の増殖表面の改変のための方法および組成物。

細胞操作のための方法および組成物は、細胞の増殖および分化に影響する生成物をコードする遺伝子を用いた細胞の遺伝的改変を包含する。その処理は、増殖を阻害または分化を誘導する化合物あるいは成長因子を供給する工程を包含し得る。あるいは、その処理は、生育培地から増殖を刺激するかまたは分化を阻害する化合物または成長因子を取り出す工程を包含する。その処理は、BAO内へのカプセル化の前または後であり得、好ましくはカプセル化の前である。さらに、細胞増殖は照射によって制御され得る。

増殖表面改変のための方法および組成物は、BAO内の少なくとも1つの増殖表

面の1つ以上の細胞外マトリックス分子(「ECM」)を用いたコーティングを含有している。ECMは、BAO内の内腔表面上または内部支持体上に、あるいは微小球キャリアー(「マイクロキャリア(microcarrier)」)上に、直接的にコートされ得る。細胞または細胞を接種したマイクロキャリアは、さらに細胞増殖を物理的に阻害するマトリックス材料内に懸濁され得る。さらにマトリックス材料は、化学薬品またはペプチド誘導体を用いて、誘導体化され得る。

さらに、BAOの増殖表面は、細胞付着を阻害するかまたはBAOの内腔表面への細胞付着を増強するために、化学的処理によって修飾され得る。さらに増殖表面は細胞の充填の前に、不活性な骨格(scaffold)の添加によって修飾され得る。その骨格は物理的に細胞の外部への増殖を阻害し、細胞接着のための付加的部位を供給する。細胞修飾および増殖表面改変のための様々な方法および組成物は相互に排他的ではなく、組み合わせて使用され得ることが理解される。

図面の簡単な説明

図1は、SV40初期領域に融合させたマウスMx1プロモーターの2.3kb断片、およびそれに続くマウスβグロビン3'非翻訳領域由来BamH1-Xba1断片を含む構築物のプラスミドマップを示す。

図2は、コントロール、非誘導体化膜(図の説明に「0%」として示した)、あるいは1%または5%PEO-PDMS誘導体化膜(図の説明にそれぞれ「1%」、「5%」として示した)に、4、11、そして25日後のカプセル化されたBHK細胞からのNGF分泌(ng/ml/24h)を示す。細胞は、マトリックスなし(図の説明に「no mat」として示した)、VitrogenTMマトリックス(図の説明に「vit」として示した)あるいはアガロースマトリックス(図の説明に「agse」として示した)とともにカプセル化した。

図3は、アガロースマトリックスの非存在下(図の説明中:n-mat-008、0709-n-m)、あるいはアガロースマトリックスの存在下(図の説明中:agaro-008、agaro-0709)でのCultiSphersTM上で増殖させたBHK細胞からのNGF放出を示す。

図4は、不活性なPHEMA骨格を有するBAO内でのカプセル化後1、14そして28日後のPC12A細胞からのカテコールアミンの放出を示す。パネルAは基底のカテコ

ールアミン放出を示す；パネルBはK⁺で刺激したカテコールアミン放出を示す。図の説明中の略語 L-dopa、NEPI、epi、DOPAC、DAおよびHVAは、それぞれL-ドーパ、ノルエピネフリン、エピネフリン、dopac、ドーパミン、およびホモバニリン酸を表す。

図5は、不活性なPHEMA/MMA骨格を有するBAO内でのカプセル化後1、14、そして28日後のPC12A細胞からのカテコールアミン放出を示す。パネルAは基底のカテコールアミン放出を示す；パネルBはK⁺で刺激したカテコールアミン放出を示す。図の説明中の略語 L-dopa、NEPI、epi、DOPAC、DAおよびHVAは、それぞれL-ドーパ、ノルエピネフリン、エピネフリン、dopac、ドーパミン、およびホモバニリン酸を表す。

図6は、アルギン酸塩マトリックスの存在下(図の説明中：CS/AL)、あるいはアガロースマトリックスの存在下(図の説明中：CS/AG)での、BAO内でのカプセル化後2、20、40、および80日後の、CultiSphersTM上で増殖させたSV40/D β 4-NGF細胞からのL-ドーパの放出を示す。

発明の詳細な説明

定義

本明細書中で用いられる「生体人工臓器」または「BAO」とは、宿主への移植について設計され得るデバイス、あるいは体外で機能し、かつ宿主へ恒久的にまたは除去可能的に取り付けられ得るデバイスである。BAOは、宿主への治療効果を有する生物学的活性分子を産生する細胞、または生きた組織を含む。BAOは、宿主受容体への移植において、生体適合性であるべきである。従って、BAOは、それが実施不能になるか、または治療上有用でなくなるのに十分な有害な宿主応答を誘起すべきではない。このような実施不能性は、例えば、カプセルの回りの線維症構造物(fibrotic structure)の形成により生じ、それによりその中の細胞への養分の拡散が制限され得る。有害な効果にはまた、カプセルの拒絶、あるいはBAOから周囲宿主組織への毒性または発熱性化合物(例えば、合成ポリマー副産物)の放出が包含され得る。

カプセルに包まれた細胞を含むBAOは、免疫隔離(immunoisolatory)特質をもつ

て構築され得る。この特質のために、宿主免疫系の要素は器官内への侵入を妨げられ、それゆえに生体人工臓器内に含まれる細胞を、有害な免疫による破壊から保護する。BAOの使用は、治療に用いられ得る細胞タイプの多様性を増加させる。移植されたBAOにおいて、このデバイスは、免疫隔離され得るかまたはされ得ないが、通常、半透過性の物理的障壁内で選択された産物を生産する細胞または組織を含み得る。この障壁は、周囲宿主組織に養分、老廃物、および分泌産物を放出し得、収容された細胞を保持し得る。しかし、免疫学的拒絶による細胞および分子エフェクターの有害な効果は最小限にし得る。けれども免疫隔離特性は、すべての場合においては必要とはされ得ない（例えば、細胞が宿主に対し自己であるかまたは同系である場合）。

「生物学的活性分子」は次のものがある。

- (a)それがつくられた細胞内で機能し得る分子、または、
- (b)細胞表面で発現し得、そして他の細胞もしくは生物学的活性分子との細胞の相互作用に影響し得る分子（例えば、神経伝達物質レセプター、または細胞接着分子）、または、
- (c)それがつくられた細胞から放出または分泌され得、そして宿主において別の標的細胞または標的分子に効果を及ぼし得る分子（例えば、神経伝達物質、ホルモン、成長因子、またはサイトカイン）。

本明細書中で用いられる用語「細胞」とは、他に記載されないときは、任意の形態の細胞を意味し、組織に保持された細胞に限らず、細胞クラスター、および個々に単離された細胞を包含する。本発明で用いられる細胞は、少なくとも1つの生物学的活性分子を産生する。

BAO内の細胞分布の制御は、BAO中の細胞数の制御、BAO内の細胞の空間的位置の制御、またはその両方に言及する。

広範な細胞が、本発明に用いられ得る。これらには、周知の公に利用され得る不死化細胞株および分裂初代細胞培養物が包含される。本発明の実施に適切な、公に利用され得る細胞株の例は、以下のものを包含する：L-6細胞、MDCK細胞、LC-PK細胞、 β -CH3細胞、C2細胞、ベビーハムスター腎(BHK)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、マウス線維芽細胞(L-M)、NIHスイスマウス胚(NIH/3T3)、アフ

リカミドリザル細胞株 (COS-a、COS-1、COS-6、COS-7、BSC-1、BSC-40、BMT-10 およびベロ (Vero)を包含する)、ラット副腎褐色細胞腫 (PC12)、ラットグリア腫瘍細胞 (C6)、RAJI (ヒトリンパ腫) 細胞、MOPC-31Cマウスプラズマ腫細胞、MN9D 細胞、MN9H細胞、ripTAgトランスジェニックマウス由来細胞、SCT-1、 β -TC細胞、Hep-G2細胞、AT-T20細胞、ベーター細胞株 (例えば、NIT細胞またはRIN細胞)、Ntera-2細胞 (Pleasureら、Journ. Neuroscience, 12, pp. 1802-15 (1992))、およびヒト星状膠細胞株 (例えばU-373およびU-937)。

用いられ得る初代細胞は、次のものを包含する: 哺乳動物の中核神経由来のbFGF 応答性神経幹／始原細胞 (Richardsら、PNAS 89, pp. 8591-8595 (1992); Rayら、PNAS 90, pp. 3602-3606 (1993))、一次線維芽細胞、シュワン細胞 (WO 92/03536)、星状膠細胞、乏突起膠細胞およびそれらの前駆体、筋芽細胞、および副腎クロム親和性細胞。例えば、このような 1 つの筋芽細胞株は C₂C₁₂細胞株である。

細胞はまた、用いられる増殖制御および分化の特定方法に依存して選択され得る。例えば、幹細胞は、化学物質を導入することにより分化を誘発する方法と共に、容易に用いられ得る。一般的には、幹細胞は、インビボにおいて通常静止状態である未分化の細胞である。しかし、増殖能力はあり、そして多くの始原細胞を発生させる能力を有する、より多くの幹細胞を生じさせ得る。この始原細胞は、次に分化したまたは分化可能な娘細胞を生じさせ得る。幹細胞は、培養において容易に拡大され得る細胞のクラスを表し、そしてその子孫は特定の成長因子の投与により末期まで分化し得る。例えば、Weissら、(PCT/CA 92/00283) 参照。

筋芽細胞は、本発明に従って BAO の中にカプセル化され得る 1 つのタイプの細胞である。筋芽細胞は、本来、中胚葉幹細胞集団に由来する筋始原細胞である。培養での分化を受け得る多くの筋芽細胞株が、入手可能である (例えば、L-6 ならびに β -CH3細胞)。一次筋芽細胞は、剖検または生検から採取した組織から容易に単離され得、そして精製され、そして拡大させられ得る。筋芽細胞は、増殖し、そして共に融合し、分化した多核形成筋管を形成する。筋管はもはや分裂しないが、筋タンパク質を生産し続ける。増殖している間、筋芽細胞は、治療用分子を産生するように容易に遺伝子操作され得る。所望の生物学的活性分子を産生するためには、筋芽細胞に 1 つまたはそれ以上の遺伝子を導入する方法は既知であ

る。筋芽細胞は、移動し、既存線維と融合し、そして導入された遺伝子のためのキャリアとして働くことが可能である。Vermaら、(WO 94/01129)；Blauら、TIG, 9, pp. 269-74(1993)；WO 93/03768；WO 90/15863。次いで、操作された細胞がカプセル化され、BAO内において分化される。あるいは、分化した細胞自体がカプセル化され得る。

細胞の選択はまた、意図された用途に依存する。BAO内の細胞は、神経伝達物質の分泌について選択され得る。そのような神経伝達物質は、ドーパミン、 γ -アミノブチル酸(GABA)、セロトニン、アセチルコリン、ノルアドレナリン、エビネフリン、グルタミン酸、およびその他のペプチド神経伝達物質を包含する。また、活性である神経伝達物質のアゴニスト、類似体、誘導体、またはフラグメントを合成し、そして分泌する細胞が用いられ得る。この細胞は、例えば、プロモクリップチン(ドーパミンアゴニスト)を分泌する細胞およびL-ドーパ(ドーパミン前駆体)を分泌する細胞を包含する。

この細胞は、それらが分泌する、ホルモン、サイトカイン、成長因子、栄養因子、血管形成誘導因子、抗体、血液凝固因子、リンホカイン、酵素、およびその他の治療因子、あるいはそのアゴニスト、前駆体、活性類似体、または活性フラグメントにより選択され得る。これらは、エンケファリン、カテコールアミン、エンドルフィン、ダイノルフィン、インシュリン、第VIII因子、エリスロポエチン、サブスタンスP、神経成長因子(NGF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮増殖因子(EGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、ニューロトロフィン-4/5、CDF/LIF、bFGF、aFGF、その他の線維芽細胞成長因子系列、毛様体神経栄養因子(CNTF)、ならびにインターロイキンを包含する。

本発明の方法において有用な細胞は、所望の生物学的活性分子を分泌する非形質転換細胞、またはそのように形質転換され得る細胞を包含することが、上記から理解されるべきである。

多くの生物学的活性分子をコードする遺伝子がクローニングされ、そしてそれらのヌクレオチド配列が公開されている。多くのこれらの遺伝子は、American Type Culture Collection(ATCC)のような寄託機関または様々な市販源から公に入

手可能である。本発明において有用な生物学的活性分子をコードする遺伝子であつて公に入手可能でないものは、例えばPCR增幅法、および任意の公開された配列からのオリゴヌクレオチドプローブを用いるゲノムもしくはcDNAライブラリーのスクリーニングのような標準組換えDNA法を用いることにより得られ得る。生物学的活性分子をコードする任意の公知の遺伝子が、本発明の方法において用いられ得る。例えば、米国特許第5,049,493号；Gageら、米国特許第5,082,670号；および米国特許第5,167,762号。

問題の遺伝子（すなわち、適切な生物学的活性分子をコードしている遺伝子）は、標準的な技術を用いて適切な発現ベクターのクローニング部位に挿入され得る。この技術は当業者に公知である。

問題の遺伝子を含む発現ベクターは、次いで本発明の方法において用いられる細胞株をトランスフェクトするのに使用され得る。標準トランスフェクション技術（例えば、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラントトランスフェクション、脂質媒介法、またはエレクトロポレーション）が利用され得る。

分裂細胞の増殖を制御する方法が、本明細書において提供される。その制御により、増殖と分化との間のバランスが、BAO内に分化した非分裂カプセル化細胞を供給するように制御され得る。分裂細胞および非分裂細胞の両方の増殖を制御する方法もまた、提供される。この制御により、BAO内の細胞分布および細胞数が制御され、結果として、壊死細胞コアの形成を減少させ、そして細胞デブリを減少させる。

遺伝子操作による増殖および分化の制御

細胞の増殖または分化に影響を与える産物をコードする遺伝子での細胞の遺伝子改変によって、細胞の増殖を制御するための方法および組成物が、本明細書中で提供される。

本発明の一局面によれば、条件付き不死化細胞株が、BAO内での増殖制御を成し遂げるために用いられる。初代細胞は、増殖促進産物をコードする遺伝子で形質転換される。この増殖促進遺伝子は調節プロモーターと作動可能に連結している。Landら、Nature, 304, pp. 596-602 (1983) またはCepko, Neuron, 1, pp.

345-53 (1988) に記載されている不死化細胞を生産するための技術は、条件付き不死化細胞を生産するように慣用的に改変され得る。

この方法によれば、細胞増殖（すなわち有糸分裂）は、増殖促進遺伝子（例えば、ガン遺伝子（例えば、c-myc、v-mos、v-Ha-ras、SV40T抗原、アデノウイルス由来E1-A））の発現を減少させることによって、阻害または停止され得る。このガン遺伝子の発現の減少は、BAOがインビポで宿主に移植されたとき、ガン遺伝子の発現を駆動するプロモーターのダウンレギュレーション、抑制、または不活性により達成される。インビトロでの調節性(regulatable)プロモーターのアップレギュレーション、活性化、または抑制解除は、増殖促進遺伝子の発現を生じ、それによりインビトロでの細胞増殖が可能となる。適切なプロモーターはインビポでダウンレギュレートされ得るプロモーターであって、例えば、グルココルチコイド応答性プロモーター（例えばPNMT (Hammangら、Neuroprotocols, 3, pp. 176-83(1993)））およびインターフェロン（「INF」）応答性プロモーター（例えばMx1(Hugら、Mol. Cell. Biol., 8, pp. 3065-79(1988); Arnheiterら、Cell, 52, pp. 51-61(1990)）のような）、レトロウイルス末端反復配列プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター（例えばlacプロモーター）、およびインシュリン応答性プロモーター。また、McDonnellら、WO 93/23431を参照のこと。プロモーターの選択は意図された移植部位に依存することが認識される。それゆえ、この方法に従えば、例えば、グルココルチコイドまたはIFNに応答性のプロモーターが、脳に移植するために有用である。グルココルチコイドおよび／あるいはIFNのレベルは、脳においてかなり低いからである。それゆえ、これらのプロモーターは、脳におけるBAOの移植においてガン遺伝子の有意なレベルの発現を導くとは期待され得ない。

1つの実施態様においては、条件付き不死化細胞は、ガン遺伝子を調節性プロモーターに作動可能に連結することにより生成される。このプロモーターは、結合タンパク質の存在下で、活性化されるか、またはアップレギュレートされる。結合タンパク質の生産は、結合タンパク質をコードする遺伝子をテトラサイクリン応答性プロモーターに作動可能に連結することによって調節され得る。

例えば、1つの実施態様は、tetリプレッサー発現を駆動する構成プロモータ

ーを含む形質転換細胞を意図する。さらに、この細胞は、CMV-IEプロモーターに作動可能に連結された異種遺伝子を包む。CMV-IEプロモーターがtetオペレーター配列を側面に配置させるなら、このプロモーターからの発現はtetリプレッサーによってオフにされ得る。tetの存在下では、tetがtetリプレッサーと結合し、他の転写因子がCMV-IEプロモーターと結合することが可能になるので、転写が起こる。この実施態様によれば、ガン遺伝子はテトラサイクリンが存在するときにのみ発現する。それゆえ、細胞はテトラサイクリンの存在下で、インビトロにおいて増殖し得る。

移植する数日前に、テトラサイクリンは、トランスジーン(transgene)発現を減少させ、そして、これに対応して、BADにおける細胞増殖を減少または停止させるために取り除かれ得る。

条件付き不死化細胞を用いた特定の実施態様においては、増殖制御はMx1プロモーターにより達成される。このMx1遺伝子はインフルエンザAおよびBへの耐性を与えるタンパク質をコードする。Mx1遺伝子はそのプロモーターによって強固に調節されている。インターフェロン(「IFN」)の非存在下では、この遺伝子は発現せず、IFN α ならびにIFN β の存在下で、この遺伝子は誘導され得る。Arnheiterら(Cell, 52, pp. 51-61(1990))は、いくつかの組織においてトランスジーンの発現を誘導し得るインターフェロンを呈するMx1トランスジェニックマウスの生成を報告している。SV40ラージT抗原は、多くの組織由来の細胞を形質転換し、そして不死化することが可能である。

1つの実施態様においては、マウスMx1プロモーターがSV40初期領域と融合され得、そしてこのキメラ遺伝子がトランスジェニックマウスを発生するために用いられ得る。Mx1プロモーター因子により与えられる強固な調節により、トランスジェニック動物から調製された組織または細胞培養物において、ガン遺伝子の発現を制御することが可能となり、それにより条件付き不死化細胞株の作出が可能となる。

IFN α またはIFN β の存在下で、このようにして生産された細胞株は、多くの他の細胞株と同じように算術的に拡大され得る。細胞分裂は、カプセル化前あるいはカプセル化後に、IFN α またはIFN β を除去することによって停止され得る。好

適な実施態様では、神経幹細胞（ニューロスフェア(neurospheres)）は、Weiss(PCT/CA 92/00283)の方法を用いたMx1-SV40 T抗原構築物を含むトランスジェニックマウスから調製され得る。こうして得られた条件付き不死化神経幹細胞株は、カプセル化され、そしてインビボで宿主に移植され得る。

加えて、所望であれば、条件付き不死化神経幹細胞株は、標準的な技術に従つて多くの任意の成長因子または神経伝達物質分子を放出するように、さらに遺伝子的に改変され得る。他のIFN応答性プロモーターもまた、この実施態様において有用であり得る。これらのプロモーターには、メタロチオネイン、H-2K^b、H-2D^d、H-2L^d、HLA-A3、HLA-DR α 、HLAクラスI遺伝子、202、56K、6-16、IP-10、ISG15、ISG54、ならびに2',5'-オリゴ(A)合成酵素が包含される。Hugら、Mol. Cell Biol., 8, pp. 3065-79(1988)を参照のこと。

この実施態様は、脳内に移植するためにはBAO中にカプセル化された細胞にとって、特に適している。脳内のIFN α およびIFN β の循環レベルは十分に低く、Mx1プロモーターによって駆動される転写活性は細胞増殖を生じるには不十分である。創始トランスジェニック動物において、T抗原の発現は数種の組織において誘導され得たが、ガン遺伝子の自然な発現は、胸腺においてだけ見られた。けれどもガン遺伝子の胸腺発現はSV40初期領域を発現したトランスジェニック動物では、比較的一般的な現象である。それゆえ、十分なガン遺伝子の発現がなければ、細胞はインビボでほぼ静止状態に保持され得る。

他の実施態様では、インビボで使用するための遺伝子操作細胞への従来のレトロウイルス感染技術において、レトロウイルスプロモーター（例えば、末端反復配列（「LTR」）プロモーター）が用いられるという所見を利用する。Gageら、（米国特許第5,082,670号）参照。これらのプロモーターによって駆動される遺伝子の発現は、典型的に、インビボでダウンレギュレートされる。このダウンレギュレーションは循環サイトカインによって媒介されると考えられる。本発明は、細胞がBAO内にカプセル化され、インビボで移植されたとき、細胞増殖を停止または減少のさせるために、レトロウイルス遺伝子の、この通常は有害なダウンレギュレーションを利用する。この場合、不死化遺伝子（ガン遺伝子）はLTRから駆動される。この遺伝子は、細胞がインビトロにおいて維持されそして拡大さ

れ

る間に、細胞を「不死化」し得る。移植後には、サイトカインの存在下で、「不死化」ガン遺伝子はダウンレギュレートされ、増殖は減少あるいは停止し、そして細胞はデバイス内で静止状態となり得る。

この実施態様に従えば、条件付き不死化細胞は、レトロウイルス感染またはcDNAでのDNAトランスフェクションによって生産され得る。このcDNAは、レトロウイルスプロモーター（例えば、LTRプロモーター）に作動可能に連結されたガン遺伝子（例えば、c-myc、v-mos、v-Ha-ras、SV40 T抗原、アデノウイルス由来E1-A）を含む。本発明者らにとって好ましいのは、モロニーマウス白血病ウイルス(MLV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、およびマウス乳ガンウイルス(MMTV)プロモーター配列である。

これらの形質転換された細胞は、通常、インビトロでガン遺伝子を発現する。首尾よく形質転換された細胞は、確立された培養技術を用いて培養において生育させ得る。LTR-トランスジーン発現は、デキサメタゾンまたは表皮成長因子の添加によって刺激され得、形質転換細胞を培養するのに必要な時間が短縮される。細胞をサイトカイン（例えば、 γ -インターフェロン(IFN- γ)、TNF- α および形質転換増殖因子- β (TGF β)）に暴露（好適にはカプセル化および移植の数日前に）することで、有糸分裂は、LTR-駆動性トランスジーン発現を妨げることによって減少し得る。SchinstineおよびGage、Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease, 71, Waxman, S.G.編, (1993); Seligerら、J. Immunol., 141, pp. 2138-44(1988); Seligerら、J. Virology, 61, p. 2567-72(1987); Seligerら、J. Virology, 62, pp. 619-21(1988)を参照。

任意の適した細胞は、上記の方法に従って、条件付き不死化され得る。当業者は、当該分野で周知のスクリーニング法によって、これには本明細書中で提供された方法に従うことも含むが、条件付き不死化について与えられた細胞タイプの適合性を決定し得る。

不死化細胞株またはその他の継続増殖細胞の増殖制御のための方法が、本明細書中で提供される。この制御は、腫瘍抑制遺伝子（例えば、p53遺伝子またはRB

遺伝子)を含むようにこれらの細胞を形質転換することによって行われ、増殖を停止または減少させる。腫瘍抑制遺伝子、または抗ガン遺伝子は増殖強制(growth

h-constraining)遺伝子と考えられる。例えば、Weinberg, Neuron, 11, pp. 191-96(1993)を参照のこと。例えば、野生種のp53活性化フラグメント1(WAF1)は、培養において、腫瘍細胞の増殖を抑制し得る。p53タンパク質によって誘導される遺伝子は腫瘍抑制因子としての生物学的役割を媒介し得ることが、理論づけられている。El-Deiryら、「WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression」Cell, 75, pp. 817-825(1993)を参照。WAF1遺伝子はCIP1遺伝子とも呼ばれる。他のp53媒介増殖阻止遺伝子は、GADD45およびGADD153(またはCHOP)を包含する。Ron, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, pp. 1985-86(1994)を参照のこと。上述した異種DNAで細胞を形質転換するための標準的な技術が、ここで用いられ得る。

1つの実施態様によれば、不死化細胞または継続増殖細胞が、調節プロモーターと作動可能に連結された腫瘍抑制遺伝子で形質転換される。適切な調節性または誘導性プロモーターの使用により、形質転換細胞がインビトロで培養されるとき、トランスジーンの発現が、ダウンレギュレートされるかまたは「オフにされ」、それゆえに増殖が可能になる。カプセル化および移植において、そのプロモーターは「誘導」されるか、またはアップレギュレートされ、そして腫瘍抑制遺伝子の発現が起こり、結果として、細胞増殖を減少または停止させる。

チロシン加水分解酵素およびエリスロポエチンプロモーターは、本発明の一局面において有用であり得る。これらのプロモーターは、典型的には、高酸素条件(例えばインビトロで直面する条件)下で「ダウンレギュレート」されるが、低酸素条件(BAO内にカプセル化され、そして宿主に移植される際に細胞が直面する条件)下では「アップレギュレート」される。

さらに、適切な連結したまたは抑制解除可能プロモーター系は、増殖抑制遺伝子の所望の調節を達成するために用いられ得る。1つの適切な系は、例えばAP1プロモーターおよび λ lacオペレーター/PGK1プロモーター系を含む(Hannanら、Gene, 130, pp. 233-39(1993)に記載)。AP1プロモーターは λ lacリプレッサー遺伝

子と作動可能に連結される。lacO(lacオペレーター)および3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK1)プロモーターは増殖抑制遺伝子と作動可能に連結される。インビトロでの外因性ホルボールエステルの添加はAP1プロモーターを誘導し、

結果として、lacリプレッサータンパク質の発現を生じる。リプレッサータンパク質の存在下では、lacO-PGK1プロモーター構築物は抑制され、そして増殖抑制遺伝子の発現は生じない。インビボでのホルボールエステル非存在下では、リプレッサータンパク質は発現されず、lacO-PGK1プロモーターが抑制解除され、そして増殖抑制遺伝子が発現される。

1つの方法によれば、適当な細胞が分化誘導産物をコードする遺伝子で形質転換される。この分化誘導遺伝子は調節性プロモーターに作動可能に連結される。この方法によれば、この分化誘導遺伝子は、カプセル化および宿主内へのインビボ移植において発現される。しかし、発現は、調節性プロモーターの適度なダウンレギュレーション、抑制、または不活性化により、インビトロで阻止または阻害され得、従って所望の細胞あるいは細胞株がインビトロで拡大される。この方法は、分裂細胞、または不死化初代細胞と共に使用され得る。高速移動群染色体タンパク質14「HMG」は、細胞の分化調節に関与する遺伝子の一例である。増殖阻止遺伝子の使用法について上述したように、インビボではアップレギュレートされるが、インビトロでは「オフにされる」あるいはダウンレギュレートされ得る任意の適切なプロモーターが、この実施態様で使用され得る。さらに、任意の適切な抑制解除プロモーター系が、上述のように、腫瘍抑制遺伝子発現の調節のために使用され得る。

増殖制御の他の方法は、アンチセンスRNAまたはDNA、あるいはそれらの誘導体を使用する。アンチセンスRNAまたはDNAは、遺伝子のコード鎖に相補的な、あるいはその遺伝子の転写から生産される「コード」mRNAに相補的な一本鎖核酸である。アンチセンスRNAがmRNAと同時に細胞中に存在する場合、アンチセンスRNAは、mRNAとハイブリダイズして二本鎖を形成し、統いてタンパク合成のためのリボソームによって翻訳され得ない。アンチセンスRNAはマイクロインジェクションまたは培養培地へのバルク添加のいずれかによって投与され得る。本発明の好ま

しい方法は、真核性発現ベクターで標的細胞をトランスフェクトすることである。Neckersら、「Antisense Technology: Biological Utility And Practical Considerations」, Am. J. Physiol., 265(Lung Cell. Mol. Physiol., 9), pp. L1-L12(1993)。

この実施態様によると、増殖誘導遺伝子または腫瘍抑制遺伝子のいずれかに対するアンチセンスRNAをコードするアンチセンス遺伝子は、誘導プロモーターに作動可能に連結され得る。このプロモーターが誘導されたときに、アンチセンスRNAが生産される。形質転換細胞が増殖誘導遺伝子を含む場合、この実施態様によれば、アンチセンスRNA生産は、インビトロでは停止またはダウンレギュレートされて細胞拡張が可能になり、そしてインビオではアップレギュレートされて増殖の停止または減少を遂げる。

あるいは、形質転換細胞が腫瘍抑制遺伝子を含む場合、アンチセンスRNA生産は、インビトロではアップレギュレートされインビオではダウンレギュレートされて、所望の増殖制御を遂げる。

さらに、アンチセンス技術は増殖または分化に必須の産物をコードする遺伝子に対して任意のアンチセンス遺伝子を構築するために使用され得る。本発明によれば、このアンチセンス遺伝子の発現の適切な誘導により、当業者は、カプセル化細胞の所望の増殖制御を達成し得る。

インビオにおいてさらなる細胞増殖を誘導することが必要または所望となる場合は、インビオで操作され得る調節性プロモーター／遺伝子構築物を使用することが好ましい。例えば、上述のMx1/SV40構築物において、ガン遺伝子発現の誘導のために、IFNは局所的または全身的に添加され得る。BAOにおけるインビオでの細胞分裂の増加は、細胞数を増加させてBAO中で死細胞を置き換え、またはBAOからの所望の生物学的活性分子の生産増加を達成させるために望ましいとされ得る。

化合物の使用による増殖および分化の制御

本発明の他の方法によれば、細胞は増殖を阻害するか、または分化を誘導する処理に曝され得る。いくつかの方法では、処理は、化合物または増殖因子を提供

する工程を包含する。別の方では、処理は、増殖培地から化合物または増殖因子を取り除く工程を包含する。この処理はBAO中でカプセル化される前または後で行われ得、好ましくはカプセル化前に行う。

使用されるタンパク質または化合物は、細胞型と所望の効果とに依存する。当業者は、慣用的な方法を用いて与えられた細胞型を、選ばれた化合物またはタン

パク質に対するその応答性についてスクリーニングし得る。

1つの方法では、細胞分布は、細胞増殖培地から増殖誘導性の化合物または増殖因子を除去することを包含する処理により制御される。一実施態様において、増殖因子（例えば、表皮成長因子（「EGF」）、形質転換増殖因子 α （「TGF- α 」）、アンフィレグリン、または任意の他の適切な因子）は、幹細胞または始原細胞（胚交換神経節由来細胞および不死化始原細胞、好ましくは神経幹細胞を包含する）の増殖を誘導するために使用され得る（Weiss、PCT/CA 92/00283）。このことにより、インビトロにおいて、神経前駆細胞の供給が維持および拡大され得る。これらの増殖誘導増殖因子の非存在下でカプセル化されたとき、神経前駆細胞は分裂および分化を終える。

神経前駆体細胞は、ホルボールエステルなどによる処理、またはポリ-L-リジンおよびポリ-L-オルニチンなどのイオン性荷電表面を含む固定化基材上の増殖によって、さらに分化を誘導され得る。分化はまた、IPら（WO 94/03199）に記載される毛様状神経栄養因子（CNTF）または神経成長因子（NGF）のいずれかの因子ファミリーの少なくとも1つのメンバーと組み合わせて、FGFファミリーの1つのメンバーで処理することによっても誘導され得る。

別の実施態様では、細胞間質中で產生される多系統性（multilineage）増殖因子（「マスト細胞増殖因子」「幹細胞因子」「c-kitリガンド」または「スティール因子（Steel factor）」とも呼ばれる）が、造血幹細胞の増殖を誘導するために使用され得る。インビトロで分裂細胞の供給を維持するために、造血幹細胞はマスト細胞増殖因子の存在下で培養される。増殖を阻止または減少させるために、マスト細胞増殖因子は培養培地から除去される。これはカプセル化の前または後に行われ得、好ましくはカプセル化前である。

増殖を促進する他の多系統性増殖因子の例は、インターロイキン-3および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を包含する。マスト細胞増殖因子はまた、他の多系統性増殖因子または系統特異的成長因子（例えば、エリスロポイエチン）との組み合わせで、細胞増殖に影響を与える。例えば、マスト細胞増殖因子は、十分に富化されたマウスの造血幹細胞の増殖および分化の誘導において、IL-3と共同して作用すると考えられる。Galliら、「The Biology of Stem Cell

Factor, a New Hematopoietic Growth Factor Involved in Stem Cell Regulation.」Int. J. Clin. Lab. Res., 23, pp. 70-77(1993)。

本発明の他の方法において、BAOにおける細胞分布の制御は、細胞増殖を阻害する、または分化を誘導する化合物または増殖因子の提供により、遂げられ得る。任意の適切な増殖阻害性または分化誘導性の化合物が、この方法に従って使用され得る。

異なる細胞型は種々の化合物に対し異なる反応を示すことが認識される。当業者は、与えられた細胞型の増殖または分化に影響を与える際の特定の化合物の効果を決定するために、それを定例的にスクリーニングすることができる。

一実施態様では、サイトカイン（例えば、形質転換増殖因子 β 1 (TGF β 1)を包含する）が、細胞増殖を阻止または阻害する、あるいは細胞分化を誘導するために使用され得る。例えば、BHK細胞における増殖減少および分化増強は、TGF β 1およびアスコルビン酸(ascorbate)への曝露により遂げられ得る。同様に、TGF β 1は、線維芽細胞における分化を誘導するため、そしてまた、ケラチン生成細胞および内皮細胞の増殖阻害因子としても使用され得る。Phillipsら、「Ascorbic Acid and Transforming Growth Factor- β 1 Increase Collagen Biosynthesis via Different Mechanisms: Coordinate Regulation of Pro α 1(I) and Pro α 1(III) Collagens」Archives of Biochemistry and Biophysics, 295, pp. 397-403(1992)。

別の実施態様では、TGF β 1、セロトニンまたはFGFが、神経内分泌細胞の増殖の制御に使用され得る。神経内分泌細胞の増殖は、それら自身の産物により自己分泌形式で制御され得る。TGF β 1は、ヒト肺臓カルチノイド細胞(BON)にとっ

て自己分泌細胞増殖阻害因子であるのに対し、FGFとセロトニンは自己分泌細胞増殖促進因子である。BON細胞の生育におけるTGF β 1の該阻害効果は、セロトニンの添加により逆転され得る。Townsend Jr.ら、「Studies of Growth Regulation in a Neuroendocrine Cell Line,」Acta Oncologica, 32, pp. 125-130(1993)。

種々の他の化学薬品はまた、この発明の方法により、細胞の増殖を停止または阻害、あるいは細胞の分化を誘導するために使用され得る。これらの化学薬品は、マイトマイシンC、5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)、プロスタグランジ

ンE₁(PGE₁)、ジブチリルcAMP、1- β -D-アラビノフラノシルサイトシン(Ara-C)、ニコチンアミドおよびヘパリンを包含する。マイトマイシンは、包括 β HC細胞株の増殖の制御に特に適用され得る。例えば、Radvanyiら、Mol. Cell. Biol., 13, pp. 4223-27(1993)を参照。

しばしば化学薬品を組み合わせたものが使用され得る。ヒト神経芽腫細胞IMR-32は、マイトマイシンCおよびBrdUまたはPGE₁およびジブチリルcAMP(dbcAMP)で処理された時に、インビトロにおいて分化を誘導され得る。Gashら、「Amitotic Neuroblastoma Cells Used for Neural Implants in Monkeys,」Science, 233, pp. 1420-22(1986)。ヒト胎児性横紋筋肉腫細胞株のAra-Cによる連続的な前処理は、化合物の除去後においてさえも、インビトロにおける著しい増殖阻害、インビボにおける腫瘍形成性の喪失、およびより分化した表現型を生じさせる。Crouchら、「Ara-C Treatment Leads to Differentiation and Reverses the Transformed Phenotype in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line,」Experimental Cell Research, 204, pp. 210-16(1993)。ニコチンアミド(NIC)はヒト胎児臍島細胞の分化および成熟を誘導すると考えられる。Otonkoskiら、「Nicotinamide Is a Potent Inducer of Endocrine Differentiation in Cultured Human Fetal Pancreatic Cells,」J. Clin. Invest., 92, pp. 1459-66(1993)。

dbcAMPの添加はまた、発育中の組織の分化に影響を与えると報告されている。例えば、dbcAMPは、星状膠細胞前駆体の分化を調整し、PC12細胞における神経突

起(neurite)形成を誘導し、そしてシュワン細胞の増殖を促進すると考えられる。Baron-Van Evercoorenら、「Schwann Cell Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition and Interaction.」Dev. Neurosci., 8, pp. 182-96(1986)。同様に、シュワン細胞の分化はアスコルビン酸に曝露することにより誘導され得る。同書に記載。

さらに、シアログリコペプチド(「SGP」)分子は細胞増殖を阻害あるいは阻止するために使用され得る。例えば、無傷ウシ大脳皮質細胞から単離された18Kダルトンの細胞表面シアログリコペプチドは、指數関数的に増殖するスイス(Swiss)3T3細胞の増殖を阻止した。例えば、Toole-Simmsら、Jour. Cell. Physiol., 147, pp. 292-97(1991); Fattaeyら、Exp. Cell. Res., 194, pp. 62-68(1991)を参照。

非常に多くの形質転換細胞型および非形質転換細胞型が、いくつかのSGPに対して感受性であることが示されている。これらの細胞は、広い範囲のセキツイおよび無セキツイ動物種由来の上皮様細胞および線維芽細胞を包含する。例えば本明細書中で参考として援用される、Fattaeyら、Jour. Cell. Physiol., 139, pp. 269-74(1989)を参照。

前述の処理のいくつかは、増殖および分化において一時的な効果しか有し得ないことが認識される。そのような場合、宿主にインビボで移植される際に、カプセル化細胞に化合物または増殖因子が継続的に補充される投与を供給することが望ましいとされ得る。これは増殖因子あるいは化合物の生体浸食性ポリマー非細胞性供給源の使用、あるいは増殖因子または化合物の細胞性供給源の同時カプセル化、あるいは任意の他の適切な手段により遂げられ得る。例えば、米国特許第5,106,627号および第5,156,844号参照。

照射による増殖の制御

細胞増殖はまた、適切な線量の照射(例えばX線、紫外線(UV)照射など)に細胞を曝露することでも制御され得る。細胞が照射を受けると、それらの細胞周期の進行は阻止され得る。臨界的な線量または最小線量は、当該分野で既知の方法を使用して、選択された細胞型に対して決定され得る。例えば、StanleyおよびLee、Radiat. Res., 133, pp. 163-9(1993); Mitchellら、Radiat. Res., 79, pp.

537-51(1979)参照。例えば、5および10mJ/cm²の紫外線B(UVB)を照射された正常ヒト表皮ケラチン生成細胞は、著しい(最大78%)増殖減少を照射後3から5日目に示した。Prystowskyら、*J. Invest. Dermatol.*, 101, pp. 54-58(1993)。Yiら、*Radiation Research*, 133, pp. 163-69(1993)は、X線曝露により細胞増殖を止めるために要求される最小線量の計算方法を提供する。

細胞外マトリックス分子の使用による増殖および分化の制御

増殖制御細胞外マトリックス(「ECM」)(またはその成分)を単独でまたは増殖制御天然マトリックスまたは他の増殖調節物質との組み合わせにより、増殖表面を改変することによって、BAOにおける細胞分布を制御するための方法が、

本明細書中に提供される。

生組織において、ECMは、細胞により分泌される種々のタンパク質および多糖類から形成され、そしてそれらを分泌する細胞に近接する網状構造中にアセンブルされる。ECM分子は、コンドロイチン(chondroitin)硫酸、フィブロネクチン、ヘパリン硫酸、ヒアルロン、デルマタン硫酸、ケラチン硫酸、ラミニン、コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)およびエラスチンのような、グリコサミノグリカン、およびプロテオグリカンを包含する。特に、コラーゲンはインビボにおけるECMの主要な成分である。ECM分子は、細胞増殖の減少および細胞分化の増加を引き起こすことが知られている。さらに、本発明の方法で使用される無細胞ECMは、BAO中にカプセル化された細胞の空間的位置に影響を与える。

ECMは、ECMを堆積することで知られる細胞(間葉性細胞または星状膠細胞起源の細胞を包含する)を培養することにより得られ得る。シュワン細胞は、アスコルビン酸およびcAMPで処理されたときに、誘導され得てECMを合成する。これらのECM成分は、基底膜の前駆体形態に類似し、これはシュワン細胞増殖を支持する。さらに、内皮細胞由来の天然に産生されるECMおよびエンゲルブレスホルムスウォーム(Engelbreth Holm-Swarm)腫瘍細胞(EHS)由来の再構成基底膜ゲルは、種々の表皮細胞および内皮細胞の増殖および分化を支持する。Baron-van Evercoorenら、「Schwann Cell Differentiation in vitro: Extracellular Matrix

Deposition and Interaction,」Dev. Neurosci., 8, pp. 182-96(1986)。

一実施態様では、増殖制御は、BAO中においてECM（またはその増殖制御成分）で成長表面をコートすることにより遂げられる。BAO中においてECMを產生する細胞を成長表面に接種すること、およびコンフルエントになるまで細胞を培養することが好ましい。この細胞は、次いで、界面活性剤およびNH₄OHで処理される。得られたBAOは増殖表面上でコートされた無細胞ECMを伴っており、これは、次いで、所望の生物学的活性分子を產生する細胞をカプセル化するために使用される。

別の実施態様では、ECMは、インビトロにおいて実質的に同様の方法で調製され、凍結乾燥され、断片化され、そして懸濁液として細胞と混合される。この細胞/ECM断片は、次いで、BAO中に共注入される。

いくつかのECM分子の存在下で生育させた細胞は、従来の単層培養中で生育させた細胞と比較して、増殖減少および分化増加を示す。例えば、アルドステロンのような特定のステロイドホルモンを合成することが知られる副腎皮質細胞は、インビトロでコラーゲンゲルの存在下で生育させた時に、増殖減少を示す。Fujiyamaら、「Influence of Extracellular Matrix on the Proliferation and Differentiation of Adrenocortical Cells in Culture,」Path. Res. Pract., 189, pp. 12051-14(1993)。

シュワン細胞もまた、コラーゲン存在下で培養した時に、増殖減少と分化増加とを示し得る。

内分泌細胞はまた、インビトロにおいてIV型コラーゲンおよびHSPGの組み合わせでコートした表面上で生育させたとき、分化することが知られている。IV型コラーゲンは細胞接着に必要であり、HSPGは分化を誘導する。de Bruineら、「Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation In Vitro in NCI-H716 Cells,」American Journal of Pathology, 142, pp. 773-782(1993)を参照。

種々の増殖因子または化合物（前述に記載のものを包含する）が、細胞の増殖および分化をさらに制御するためにECM成分に添加され得る。増殖因子は、移植

前にインビトロで細胞にまたはインビボで細胞にあるいはその両方で投与され得る。例えば、米国特許第5,156,844号および同第5,106,627号を参照。これら特許は、増殖因子をその増殖因子の共カプセル化された細胞性または非細胞性供給源のいずれか一方を用いて送達する方法について言及する。さらに、ECM分子は公知の技術に従って増殖制御ペプチドで誘導体化され得る。

例えば、形質転換増殖因子- β （自身で細胞増殖を調整し、そして可逆的に特定のECM分子（例えば、デコリン）と結合する）は、ECM分子の増殖阻害効果を増加するためにECMに添加され得る。

同様に、ヘパリンもまた非形質転換細胞および形質転換細胞株両者の増殖を妨害することが示されている。Matuokaら、Cell Structure and Function, 9, p. 357 (1984)。

塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）もまた、ECM成分と共に添加されたとき、

内分泌細胞の分化を増強することが報告されている。de Bruineら、「Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation In Vitro in NCI-H716 Cells」American Journal of Pathology, 142, pp. 773-782 (1993)。

増殖因子は、ECMの異なる成分と組み合わされた時に、細胞に対して異なる効果を示し得る。例えば、線維芽細胞増殖因子（FGF）は効果的な分化因子であり、そしてラミニン上で生育させたクロム親和性細胞にとって弱有糸分裂誘導物質であることが示されている。しかし、FGFがコラーゲン上で生育させたクロム親和性細胞に添加されたとき、FGFは弱分化因子および強有糸分裂誘導物質である。この挙動はまた、サイクリックAMPアナログである8-(4-クロロフェニルチオ)サイクリックAMPについても示されている。Chuら、Neuroscience, 95, pp. 43-54 (1994)。

表1は、特定の細胞型において増殖および分化に影響を与えることが知られるECM分子、増殖因子、および化合物の部分的なリストである。

表1：増殖または分化に影響を与えるECM分子、増殖因子、および化合物

| 細胞型 | 分化誘導因子／増殖阻害因子 | 増殖促進因子 |
|--|--|--|
| シラバ | アスコルビン酸；コラーゲン(Vitrogen TM)；カルシスферス(Cultispheres)/TGF- α | TGF- β ; dbcAMP |
| PC12 | NGF; dbcAMP; SGP | |
| 線維様芽細胞 | TGF- β -1;カルシスферス(Cultispheres)/TGF- α ；アスコルビン酸；SGP | Vitrogen TM |
| 筋芽細胞 | コラーゲン；アスコルビン酸 | |
| 神経幹 | ラミニン； λ -プロテイヌ2000；カルシスферス(Cultispheres)/ λ -プロテイヌ2000；ホルムレースカル； λ -リソ；FGFおよびCNTFまたはNGF | EGF; bFGF; TGF- α ；アンフィブリリン |
| ヒト胎児性横紋筋肉腫細胞株 | Ara-C | |
| ヒト胎児脾臓島細胞 | ニコチンアミド(NIC) | |
| 星状膠芽細胞 | dbcAMP | |
| スイス(Swiss) 3T3 | SGP | |
| 副腎皮質細胞 | コラーゲン | |
| 内分泌細胞 | IV型コラーゲン + HSPG; bFGF + ECM成分 | |
| 乳腺癌細胞 | FGF + ラミニン；8-(4-アセチル-2-オキソ)サクレチルAMP + ラミニン | FGF + コラーゲン；8-(4-アセチル-2-オキソ)サクレチルAMP + コラーゲン |
| 造血幹細胞 | | マスト細胞増殖因子 |
| BHK | TGF β -1 + アスコルビン酸；E1573; 頸膜細胞由来ECM | |
| ケラチン生成細胞 | TGF β -1 | |
| 内皮細胞 | TGF β -1 | |
| 神経内分泌細胞 (ヒト脾臓細胞/仔 (caranoid)細胞(BON)) | TGF β -1 | TGF β -1 + アスコルビン酸； カルニン；FGF |
| ヒト神経芽細胞株IMR-32 | アラニンC + BrdU; PGE ₁ + dbcAMP; SGP | |
| SCT-1 | コラーゲン；アスコルビン酸 | |

BAOの増殖表面は、BAOの管腔表面を含み、さらに、他の増殖表面、例えば、BAOの内部にカプセル化され得る内部支持体を含む。

マイクロキャリアは細胞増殖のための表面を提供し得る。マイクロキャリアの使用により、より多量の細胞をカプセル化し得、そして、均一にBAOの中で、特に、増殖の接触が阻害される細胞に対して、分布し得る。マイクロキャリアのう

のいくつかのタイプは、市販されており、デキストランマイクロキャリアである Cytodex (Sigma, St. Louis, MO)、およびマクロ孔質 (macroporous) ゼラチンのマイクロキャリアである CultiSphereTM (HyClone Labs, Logan, UT)、およびガラスマイクロキャリアが挙げられる。これらのマイクロキャリアはしばしば、足場依存性細胞の培地に用いられる。マクロ孔質ゼラチンマイクロキャリア上での増殖が見られる細胞株には、OBHK、BHK-21、L-929、CHO-K1、rCHO、MDCK、V79、F9、HeLa、およびMDBKが挙げられる。マイクロキャリアはまた、他のECM分子（例えば、コラーゲンによりコートされたマイクロキャリアである FACTTM (Solo III Labs, Ann Arbor, MI)）または、実質的に上記の、無細胞ECMにより作製またはコートされ得る。

1つの好ましい実施態様として、所望の生物学的活性分子を產生する細胞は、カプセル化および移植の前に、ECMでコートされたマイクロキャリア表面の上に接種され得、そして、インビトロでマイクロキャリア上で培養され得る。Cherks ey (WO 93/14790) は、ガラスまたはプラスチックのミクロビーズ上での細胞の培養と、それに続くレシピエントの脳へのミクロビーズの移植について言及している。

本発明における別の実施態様として、マイクロキャリアに接種された細胞は、適切な増殖阻害マトリックスの存在下で懸濁され得、次いで、BAOの中にカプセル化され得る。そのようなマトリックス材料（例えば、線維芽細胞に対してはアガロースまたは寒天、副腎皮質細胞に対してはコラーゲン）は、物理的に細胞のさらなる成長を阻害する。そのようなヒドロゲルマトリックスは、例えば、Dion ne WO 92/19195に記述され、本明細書中で参考として援用されている。

本発明の別の局面に従って、アガロースはまた、ペプチド配列での誘導体化 (derivatization) によるECMの代替物として使用され得、マトリックスへの細

胞付着に影響する。例えば、アガロースヒドロゲルは、ラミニンまたはフィブロネクチンのペプチド配列により誘導体化され (derivatized) 得る。

この方法においては、細胞は3-Dマトリックスの中に懸濁される。この3-Dマトリックスは、細胞の接着に関与する細胞表面レセプター分子を認識するペプチド

配列により誘導体化されたアガロースからなる。いくらかのペプチド配列は、(2-Dで)細胞接着を促進することが示されている。例えば、Pierschbacherら, Science, 309, 30-33頁 (1984); Grafら, Biochemistry, 26, 6896-900頁 (1987); Smallheiserら, Dev. Brain Res., 12, 136-40頁 (1984); Juckerら, J. Neurosci. Res., 28, 507-17頁 (1991) を参照。本発明の誘導体化されたアガロースマトリックスにより3-Dでの細胞接着のための適切な分子の手振り(cue)を提示し得る。アガロース濃度は好ましくは1.25% (w/v) 以下であり、最も好ましくは約1.0%である。本発明者らは、RGD含有配列(すなわち、ArgGlyAsp; AA₂-AA₄ 配列番号2)、YIGSR含有配列(TyrIleGlySerArg; AA₅-AA₉ 配列番号1)、IKVAV含有配列(IleLysValAlaVal; AA₁₁-AA₁₅ 配列番号3)、などが好ましいと考えている。誘導体化は、1'1'カルボニルジイミダゾールのような2官能のカップリング剤を使用することにより、または他の適切な方法により達成され得る。

ECM成分の代わりにアガロースを用いることの特別に有利な点の1つは、天然に存在するECM成分が経時的にインビボで酵素的に分解され得るのに対し、アガロースはそれほど容易には分解しないことである。アガロースの使用もまた有利である。なぜなら、アガロースが、Matrigel®(腫瘍細胞株から得られ、そしてそのため不特定な混合物である)のような物質とは違って、特定される産生物であるからである。具体的には、Matrigel®が、多くの細胞のタイプに対する強力な分裂促進剤であるbFGFを含むことが開示されている。アガロースは、透明であり、多糖類からなる熱可逆性のヒドロゲルである。物理的に細胞の増殖を制限することに加えて、アガロースはそれ自身で、増殖を阻害し得、分化を誘導し得る。例えば、Aulhouse「インビトロでのヒト軟骨細胞の表現型の発現」In Vitro Cellular & Developmental Biology, 25, 659-668頁 (1989) を参照。

アガロースは、誘導体、例えばPEO-PDMSによって化学的に修飾され得、さらに、好ましくは細胞へ毒性効果を与えずにさらに細胞の外部増殖を阻害する。

様々な細胞のタイプが、特定のECM分子または特異的な供給源からの無細胞のECMに対して様々な応答性を示し得ることが理解される。例えば、本明細書中で援用する、EndおよびEngelの「細胞外マトリックスのマルチドメインパク質と

細胞の増殖」79-129頁, Receptors For Extracellular Matrix、McDonaldおよびMecham編、Academic Press, New York (1991) を参照。当業者は細胞のタイプを容易にスクリーニングして、ECM分子または特異的供給源からの無細胞ECMへのその応答性を測定し、細胞の分布を制御する際の有効性を測定し得る。

BAOの増殖表面修飾による増殖制御

BAO内の細胞数と細胞の位置とを制御するために増殖表面を化学的に修飾することにより、BAOの細胞増殖を制御する方法が本明細書に提供される。人工臓器内の増殖表面は修飾され得、それにより増殖表面への細胞付着を制御し得る。BAO内の増殖表面は、BAOの管腔表面または内膜、マイクロキャリアまたはBAO内部に配置される内部支持体の管腔表面となり得る。マイクロキャリアと内部支持体を用いる実施態様では、細胞はインビトロのこれらの構造上で培養され得、統いて移植のためにBAOの中にカプセル化され得る。

BAOの膜は多数の異なる公知の方法により修飾され得、その方法にはカルボン酸基、アミン基、もしくは水酸基または他の反応性官能基を生成するための化学的な修飾方法が含まれる、あるいは、BAOの膜は吸収によって修飾され得る。これらの反応性官能基（それ以外はポリマーのバックボーン（backbone）上には存在しない）は、統いてさらなる誘導体化のための部位として用いられ得る。

1つの実施態様として、BAOの管腔の表面は、BAOへの細胞の付着を促進するために修飾される。制御された管腔の表面への細胞付着は細胞の生存を促進するのに有用であり得る。細胞を膜に優先的に付着させることにより、ヒドロゲル懸濁液を用いる固定化技術において用いられる場合よりもより少ない細胞で、カプセル内に均等な細胞の分布を達成し得る。より少ない細胞を用いれば、細胞破碎物の量がより少なくなる。他の利点は、細胞が膜に密に接触するため、栄養素の拡散が高められることである。カプセルの中でマトリックス材料を伴わずに膜の修飾が成される場合には、ゲルによる輸送という煩雑さと、タンパク質または細胞

産生物のマトリックス材料への吸収もまた避けられ得る。細胞の付着は、BAOの管腔表面を様々な分子量のポリ（d-リジン）で処理することにより促進し得る。ポリ（d-リジン）は、pH 11の緩衝溶液からBAOの管腔表面に吸収され得る。本発

明者らはおよそ67,000g/モルのポリ(d-リジン)が好ましいと考える。

加えて、ペプチド誘導体、例えば、RGD含有配列(ArgGlyAsp；配列番号2のAA₂-AA₄)、YIGSR含有配列(TyrIleGlySerArg；配列番号1のAA₆-AA₉) (CDPGYIGSR (CysAspProGlyTyrIleGlySerArg；配列番号1)を含む)、およびIKVAV含有配列(IleLysValAlaVal；配列番号3のAA₁₁-AA₁₅) (好ましくはCysSerArgAlaArgLysGlnAlaAlaSerIleLysValAlaValSerAlaAspArg；配列番号3)は、特に、細胞の付着を促進するのに有用であることを見いだした。例えば、RGD (ArgGlyAsp；配列番号2のAA₂-AA₄)は、これらのペプチドの中に最も多いため、公知の技術を用いることにより、BAOの膜に化学的に付着され得る。いくつかのRGD (ArgGlyAsp；配列番号2のAA₂-AA₄)含有分子は、市販されている(例えば、PepTide-2000TM (Tellios))。

別の実施態様として、BAOの膜は細胞付着を阻害するために、例えば、PEO-PDMSまたはポリ(d-リジン)-アルギネートの吸収により、修飾され得る。本発明者はPEO-PDMSの修飾が好適であり、特に、増殖表面が多孔性である場合には好適である、と考える。なぜならPEO-PDMSは孔を通じて拡散する傾向があり、そして、孔を通る際に、疎水性-疎水性結合を介して表面に吸収される傾向があるからである。特に、低分子量(600-3000g/モル)のPEO-PDMSが好ましい。

この実施態様は、細胞がマイクロキャリアの上で増殖し、そしてBAO内にカプセル化された場合に特に有効である。この方法では、均等な細胞分布が達成され得、細胞の数が制御され得る、そして細胞接着はマイクロキャリアに限定され得る。

加えて、細胞付着を促進する化合物および細胞付着を阻害する化合物は、組み合わせて用いられ得る。例えば、BAOの管腔表面は細胞付着阻害化合物で処理され得、そして、細胞保有マイクロスフェア、または、(用いられる場合には)細胞周辺のマトリックスは、細胞付着促進化合物により処理し得る。

他の実施態様として、BAOの内部は、細胞を充填する>Loading(前)のBAO内に

不活性な骨格(scaffold)を提供することにより改変され得る。この骨格は、細胞に接着し、そしてカプセル内に細胞を均一に分布させるための構造を提供し得

る。不活性な骨格の調製に有用な化合物としては、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート) (「PHEMA」) およびポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート-コ-メチルメタクリレート) (「PHEMA/MMA」) が挙げられる。さらに、骨格は、増殖および分化をさらに制御するために、上記のものを含む様々な化学薬品またはタンパク質により誘導体化され得る。この方法により、適切な骨格材料の溶液は、BAO内で沈殿して所望の骨格となる。

別の実施態様は、内部支持体の役割を果たすメンバー上で細胞を培養することを意図する。内部支持体はチタンまたは適切なポリマーのような実質的に生体適合性の任意の材料から作製され得る。支持体は、支柱の形態であり得るが、または骨格としても機能するように設計され得、これは、細胞の増殖に大量の表面積を与えることによってなされる。このような骨格材料の1つの例としてはポリエスティル不織布 (NWPF) (Reemay, Tennessee) がある。NWPFには多くのタイプがあり、網目 (weave) の詰まりおよびシートの厚みが異なる。このような技術により、BAO内の細胞数、およびBAOへの挿入前の細胞/骨格の適正化能を精確に制御し得る。さらに、(デバイスの外側の) そのような材料上で培養される細胞の分化を、材料のデバイスへの挿入前に達成させてもよい。そのような骨格を、例えば、細胞接着ペプチドで修飾して、細胞分化を誘導してもよい。加えて、この物質はBAOに強度を付与する。内部支持体を含むBAOの作製は、同時係属出願 (出願番号 08/105,728) 中に記載されている。

本発明において有用なBAOは、典型的に少なくとも1つの半透過性の外部表面膜または細胞含有コアを囲む被覆物 (jacket) を有する。この被覆物は栄養素、生物学的活性分子およびその他の選択された産生物をBAOを介して拡散することが可能である。このBAOは生体適合性であり、そして、好ましくは免疫隔離性である。そのコアは、分離された細胞を含み、液体培地中に懸濁されているか、またはヒドロゲルマトリックス内に固定されている。

BAO内の細胞の分布を制御するための上記の方法および組成物は上記に限られたものではないことが理解される。所望の増殖制御を達成するためには、いくつ

かの方法および組成物を組み合わせて用いることが好ましい。

例えば、本発明の方法に従って、増殖制御遺伝子を含むように遺伝的に改変された細胞を生産し、これらの細胞をECMマイクロキャリア上で増殖し、そして、細胞／マイクロキャリアのクラスターをBAO（その内部で1以上の増殖表面が細胞の分布を制御するために修飾されている）にカプセル化することが所望され得る。

BAOのカプセル化膜はそのコアの材料と同じ材料からなるものであり得るか、または別の材料からなるものであり得る。いずれの場合においても、BAOの周辺または辺縁膜領域（透過選択性かつ生体適合性である）が形成される。この膜はまた、所望であれば、免疫隔離性であるように構成され得る。

このBAOを構成するのに用いられる材料の選択は多くの因子により決定され、そしてそれは、Dionne WO 92/19195中に詳細に記載されている。簡単に説明すると、様々なポリマー、およびポリマーブレンドがそのカプセル被覆物を製造するのに使用され得る。本明細書中のBAOを形成するポリマー膜および増殖表面としては、ポリアクリレート（アクリルコポリマーを含む）、ポリビニリデン、ポリ塩化ビニルコポリマー、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリアミド、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ポリスルホン、ポリホスファゼン（polyphosphazene）、ポリアクリロニトリル、ポリ（アクリロニトリル／コビニルクロリド）、ならびにこれらの誘導体、コポリマーおよび混合物が挙げられ得る。

BAOは、当該分野の公知のいずれかの適切な方法で形成され得る。そのような1つの方法としては、ポリマーキャスト溶液および凝固剤（これは生物学的組織フラグメント、オルガネラ、または細胞および／または他の治療剤の懸濁液（Dionne WO 92/19195および米国特許第5,158,881号、同第5,283,187号、および同第5,284,761号（本明細書中で参考として援用される）に記述されている）を含み得る）の共押出しを包含する。

被覆物は单一の皮膜（skin）（タイプ1、2）、または二重の皮膜（タイプ4）を有し得る。单一被膜の中空纖維は共押出しされる際にポリマー溶液の表面のうちのただ1つをクエンチすることにより生産され得る。二重の皮膜の中空纖維は共押出しされる際にポリマー溶液の両方の表面をクエンチすることにより生

産され得る。典型的には、タイプ1の中空纖維が、タイプ4の中空纖維と比較して、より大きなパーセントの外部表面がマクロ孔 (macropore) で占められている。タイプ2の中空纖維はその中間である。

たくさんのカプセルの立体配置、例えば円筒形、円盤形、球形があり得る。

BAOの被覆物は、透過選択性膜の見かけの分子量限界 (nMWCO) を定する孔サイズを有する。nMWCOよりも大きい分子は物理的に膜の透過を阻止される。見かけの分子量限界は対流状 (convective) 条件下で90%の排除と定義される。BAOが免疫隔離性のあることが望ましい状況においては、膜の孔サイズは、細胞により產生される特定の因子のビヒクルからの拡散を可能にするが、宿主の免疫応答因子がBAOに侵入するのを防げるよう選択される。典型的にはnMWCOの範囲は50kDと200kDとの間であり、好ましくは90kDと150kDとの間である。最も適切な膜組成物はまた、宿主の免疫エフェクター分子（選択された移植部位に存在することが知られている）とBAOの外膜成分との間の反応性を最小限にする。

そのBAOのコアはBAO内で分離される特定の細胞に、適切な環境を提供する。コアは、細胞の増殖を維持するのに十分な液体培地を含み得る。液体コア (liquid core) は、PC12細胞のような形質転換した細胞株を維持するのに特に適切である。あるいは、そのコアはゲルマトリックスを含み得る。ゲルマトリックスはヒドロゲル（アルギネット「VitrogenTM」など）または細胞外マトリックス成分からなり得る。例えば、Dionne WO 92/19195を参照。

ヒドロゲルを構成する組成物は3つの一般的なクラスに分けられる。第1のクラスは正味の負の電荷を保有する（例えばアルギネット）。第2のクラスは正味の正の電荷を保有する（例えばコラーゲンおよびラミニン）。市販の細胞外マトリックス成分の例としては、MatrigelTM、およびVitrogenTMが挙げられる。第3のクラスは、電荷が正味中性である（例えば、高架橋ポリエチレンオキシドまたはポリビニルアルコール）。

BAOをシールする適切ないずれの方法を使用してもよく、その方法は、ポリマー接着の使用 (employment)、および／または、クリンプ (crimping) 工程、結ぶ (knotting) 工程、そして熱シール工程を包含する。これらのシール技術は当該分野で公知である。加えて、いずれの「乾燥」シール法がまた使用可能である

このような方法においては、実質的に孔のない型（これを通して細胞含有溶液が導入される）が提供される。充填後、BAOはシールされる。そのような方法は米国特許出願第08/082,407号に記載され、本明細書中で参考として援用される。

インビポの移植の前にBAOの機能性を確立するために、1以上のインビトロのアッセイが好ましく用いられる。当該分野で周知のアッセイまたは診断試験はこれらの目的に使用され得る。例えば、Methods In Enzymology, Abelson編、Academic Press, 1993を参照。例えば、ELISA（酵素結合性免疫吸着剤検定法）、クロマトグラフィーアッセイまたは酵素的アッセイ、あるいは分泌産生物特異的なバイオアッセイが使用可能である。所望であれば、移植の分泌機能は、適切なサンプル（例えば、血清）をレシピエントから回収してそれらをアッセイすることにより、経時的にモニターし得る。レシピエントが靈長類の場合、ミクロ透析が使用され得る。

BAOの数およびBAOのサイズは、特有の適用に要求される生物学的活性の量により決定される移植の治療効果を生じるに十分であるべきである。分泌細胞が治療物質を放出する場合には、当該分野に公知の標準的な投薬への考慮および標準が必要な分泌物質の量の決定に用いられる。考慮すべき因子は、Dionne WO 92/19195に記述されている。

BAOの移植は滅菌状態で行われる。一般的に、BAOは宿主内の部位で移植されるが、その部位は、宿主へ分泌産生物または機能を適切に送達し得る部位であって、カプセル化された細胞または組織へ栄養素を適切に送達し得る部位であり、そしてまた、回復および置換のために、BAOにアクセスし得る部位でもある。好ましい宿主は靈長類であり、最も好ましくはヒトである。

多くの異なる移植位置が意図される。これらの移植位置には、中枢神経系（脳、脊髄を含む）、ならびに、眼の房水様液および硝子体液が挙げられる。脳の中で好ましい部位は、線条、大脳皮質、視床下部の核、およびMeynertの底部の核がある。他の好ましい部位としては、中枢神経の液体、最も好ましくはクモ膜下の場所および側脳室である。本発明はまた、腎臓被膜下の部位、ならびに腹膜内

部位および皮下部位、または他のいずれかの治療上有益な部位への移植を意図する。

本発明をより理解するために、以下の実施例により説明する。これらの実施例

は例示のみを目的とし、そしていかなる態様においても本願発明の範囲を限定するものと解釈されるものではない。

実施例

実施例1 - Mx1プロモーターを用いる増殖制御

マウスMx1プロモーターをSV40初期領域と融合した。そして、このキメラ遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作成した。Mx1プロモーターエレメントはIFN α またはIFN β の存在下で誘導されるので、トランスジェニックマウスから調製された組織または細胞の培養物内でのガン遺伝子の発現は制御され得る。従って、条件付きで不死化された細胞株が產生され得る。

トランスジェニックマウスの産出

本発明者らが用いたMx1-Tag構築物は、完全なSV40初期領域cDNAに融合した約2kbのMx1プロモーター（すなわち、Xba1-EcoR1断片）から成った。これは、ラジT抗原およびスマールT抗原の両方をコードし、マウス β グロビン3'非翻訳領域の上流およびポリAシグナル（BamH1-Xba1断片）を融合する。 β グロビン配列は、スプライス部位を付与し、そしてトランスジェニック動物内におけるcDNAの発現を高めるために含まれた。図1はMx-1構築物のプラスミドマップを示す。

Mx1-Tag構築物を含有するトランスジェニックマウスは、単一細胞のマウス受精卵への生殖核マイクロインジェクション（pro-nuclear microinjection）の標準的な技術によって作成された（Brinsterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4438-4442頁(1985)）。創始動物由来の組織のサザンプロット分析により、トランスジーンの完全なコピーがゲノム中に組み込まれていることが確認された。

これらのマウスの子孫は、SV40の初期領域の配列を認識するPCRアンプライマーを用いて、「DNA陽性」と確認された。

条件付きで不死化した幹細胞

E15トランスジェニックマウスの胎児およびDNA陰性の同腹子から線条体を取り

出し、EGFを含むニューロスフェア (neurosphere) 培地 (100ml当たり、50mlのD
DH₂O、10mlの10×DMEM/F12、2.0mlの30%グルコース、1.5mlのNaHCO₃、0.5mlの
1M HEPES、1.0のL-グルタミン、10mlの10×ホルモン混合物、25mlのDDH₂O (フ

ィルターの洗浄用)) 中において初代の (個々の) 細胞培養物として播種した。

ニューロスフェアは、Weissの方法 (PCT CA92/00283) ならびにReynoldsおよびWeissの方法 (J. Neuroscience, 12, 4565-74頁 (1992)) に従って調製した。細胞を1週間に1度、7回継代し、次いで2つのグループに分けた：外来性のインターフェロン (IFN) を有するグループおよび有しないグループ。細胞をEGF含有ニューロスフェア培地中で、500,000細胞/5mlの播種密度でT25フラスコ内に播種した。1000ユニット/mlのIFNを細胞の1/2に加えた。コントロールのニューロスフェアにはIFNを付加しなかった。細胞を37°C、5% CO₂でインキュベートし、毎週継代した。

30回の継代後 (IFNで23回継代) 、細胞を15ml中に1,250,000細胞の細胞密度で1000ユニットのIFNを有する血清含有培地 (DMEM、5%ウシ胎児血清、および1×L-グルタミン) 中に播種した。1日おきに新鮮なIFNを加えた。

7日後、培地を取り除き、細胞をハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) で洗浄し、フラスコを軽くトリプシン処理した。細胞を10mlの血清含有培地に再懸濁し、1000 RPMで2分間スピニングウンし、培地を吸引除去した。次いで、細胞を2mlの血清培地に炎で先を丸くした (fire-polished) ピペットで細かく碎いて (trituring) 再懸濁した。

約25,000の細胞を5% FBSを含むDMEM中で、ポリオルニチン処理したカバーグラスに塗布した。1日おきに半分のカバーグラスにIFN (1000ユニット) を加えた。SV40のT抗原 (Tag) 、および星状膠細胞に特異的に発現する中間フィラメントタンパク質であるグリア纖維酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) について様々な間隔で、以下のプロトコルに従って細胞を染色した。

カバーグラスを0.1Mリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) における4%パラホルムアルデヒドに20分間室温で浸し、次いでPBSで5分間、2回洗浄した。細胞を100

%エタノールで2分間浸透し、次いで、再度0.1M PBSで5分間、2回洗浄した。

細胞を0.1M PBS中に希釈した5%NGS(正常ヤギ血清)で少なくとも30分間室温でブロックした。1次抗体をプールし、1%NGS中で2時間希釈し、室温でカバーグラスに以下のように添加した：抗Tag(マウスモノクローナル)を1:10に希

釈し、抗GFAP(ウサギポリクローナル)を1:500に希釈した。1次抗体を除去し、次いでカバーグラスをPBSで5分間、2回洗浄した。

2次抗体をプールし、1%NGSで希釈し、室温で、暗所でカバーグラスに以下のように添加した：GAM-FITC(1:128)；GAR-テキサスレッド(1:100に希釈)。2次抗体を除去し、そしてカバーグラスを暗所でPBSで5分間、2回洗浄した。

カバーグラスをCitifluorTM(または他の抗フェーデント(fadent)固定媒体)を用いてスライド上に固定し、ローダミンおよびフルオロレセイン光学レンズを備えた蛍光顕微鏡を用いて観察するまで4°Cで保存した。

一連の本実験において、本発明者らは、インターフェロンの除去後、いかに迅速にT-抗原のレベルが低下するかの測定を開始した。さらに、本発明者らは細胞の増殖および分化におけるT-抗原レベルの効果の測定に关心があった。分化はGFAPレベルのモニターにより評価された。GFAPは成熟星状膠細胞において特異的に発現される中間フィラメントタンパク質である。以下の免疫蛍光の結果が観察された。

| 日 | IFN(1000ユニット/ml) | | コントロール(IFNなし) | |
|----|------------------|------|---------------|------|
| | Tag | GFAP | Tag | GFAP |
| 1 | +++ | - | +++ | - |
| 4 | +++ | - | + | +/- |
| 7 | +++ | - | +/- | +/- |
| 10 | +++ | - | - | + |

従って、TagおよびGFAPの免疫染色で示されるように、血清培地中の一定期間の後、IFN処理した細胞は、T-抗原の持続的な発現、持続的な増殖を示したが、GFAP発現の証拠はなく、一方、コントロール(IFNなし)では、分化が始まり(アップレギュレートされたGFAP発現)そして分裂が終了した。このことは、カバ

一グラスの視覚的な検査により確認された。--4日目までに細胞数において明確に認められる差があった。10日目までにIFN処理細胞はコントロールよりも非常に多くなった。

この構築物におけるSV40 T-抗原の発現は、用量依存様式に調節される。発明

者が作成した細胞株では、最大のT-抗原発現（免疫蛍光により測定された）は500-1000ユニット/mlのIFN用量で観察された。100ユニット/mlで、本発明者らは発現量は極小から全くないことを観察した。予想され得るように、増殖速度はIFN用量と相関した；100ユニット/mlのIFNで、細胞分裂はほとんどないかまたは全くなかった。

上記のMx1 Tag EGF-応答性神経幹細胞を用いたさらなる研究において、本発明者らは増殖および分化は制御され得ることを示した。これらの幹細胞の集団群は、EGFの除去およびFBSの添加により分化を余儀なくされた。1000ユニット/mlの α/β IFNの添加に伴い、平坦な星状膠細胞様の細胞のクラスターが増殖を始め、そして最終的に培養皿を埋め尽くした。本発明者らは、これらの細胞をIFN中で70継代以上連続的に維持し、この期間にわたって24-36時間の倍加速度を維持した。神経およびグリア特異的抗体のパネルでプローブした場合、これらのIFで処理した細胞は、事実上全てネスチン（nestin）およびT-抗原陽性であったが、グルタミンシンセターゼに弱い免疫反応性があり、GFAP陰性であった。

IFNを除去すると、これらの平坦な細胞は、急速にその分裂速度を減少し、T-抗原免疫反応性を失い、そして徐々にグルタミンシンセターゼおよびGFAP免疫反応性を増加した。これらの細胞はインビトロで数カ月生存し、そして明らかな増殖はIFNの連続的な非存在下では認められなかった。興味深いことに、T-抗原免疫反応性および細胞増殖はIFNの添加に伴い再誘導され得る。このことは、制御された様式で増殖または分化する能力を細胞株に与えている。

実施例2

実施例1に従って調製した細胞をカプセル化し、ヒト宿主に移植する。

PAN/PVCファイバーの調製

選択性透過中空ファイバーをドライジェットウェット紡糸技術（dry jet-wet

spinning technique) (Cabasso, Hollow Fiber Membranes, 12巻, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York, 第3版, 492-517頁, 1980; Dionne, WO 92/19195; 米国特許第5,158,881号) を用いて調製した。非対

称性の中空ファイバーは、ジメチルスルホキシド中で12.5%のポリアクリロニトリルポリビニルクロライド(PAN/PVC)共重合体(W/W)の溶液からキャストされる。1重膜あるいは2重膜のファイバーが作成される。ファイバーを非溶媒性のウォーターバス中で集め、グリセリンで処理し、乾燥する。細胞をPAN/PVCの1重膜の中空ファイバー中に25,000細胞/ μ lの密度で充填し、ヒートピンチング(heat pinching)でシールする。

宿主への移植

カプセル化した細胞をヒト宿主に移植する。移植部位は側脳室および脳の線状体を含有する。脳へのBAOの移植手順は、Aebischerら、WO 93/00127に記述されている(本明細書中で参考として援用される)。

実施例3 - 新生児星状膠細胞の条件付き不死化

マウス乳腫癌ウイルス(MMTV)のプロモーターエレメントを含有するフラグメントをSV40初期領域cDNAに融合する。新生児星状膠細胞由来のE15ラット脳を、エレクトロポレーションでトランスフェクトし、そして形質転換体を増殖についてアッセイにより選択する。分裂性細胞を除去し、広げ、そして抗ラージT抗体を用いて、ラージT-抗原の発現についてアッセイする。形質転換細胞をBAO中にカプセル化し、そして実質上、実施例2に示したように宿主内に移植する。BAOをインビポで1カ月保持する。次いで、BAOを回収し、BAO中の細胞分布を同一期間インビトロで保持したものと比較する。

実施例4 - SCT-1細胞のコラーゲンによる低下した増殖およびアスコルビン酸によって誘導される分化

SCT-1細胞をPo-SV40トランスジェニックマウスの座骨神経腫瘍からクローニングした(Messingら、J. Neuroscience, 14, 3533-39頁(1994))。このSCT-1細胞は、Schwann細胞マーカーS100およびPoに対して、ならびにSV40 T-抗原に対して

免疫反応性があった。

SCT-1細胞を、3つの条件下で増殖させた：（1）アスコルビン酸を加えず、組織培養プラスチック上、（2）分化を誘導するため、50μg/mlのアスコルビン酸存在下で組織培養プラスチック上、そして（3）I型コラーゲン中に懸濁させた。

アスコルビン酸の非存在下ではプラスチックの下層で、ほとんどの細胞が纖維芽細胞様の形態を示した。しかしながら、いくつかの両極性の細胞が存在した。細胞は18-20時間で倍加し、接触阻害を全く示さなかった。

アスコルビン酸存在下で増殖したSCT-1細胞は、より遅い増殖を示し、そしてフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対してより強い染色を示した。一方、ラミニン免疫応答性は、コントロール培養物およびアスコルビン酸によって誘導される分化培養物と同様であった。

I型コラーゲン中に懸濁したSCT-1細胞は、両極性の形態、および有糸分裂活性の顕著な減少を示した（すなわち、倍加時間が30日以上であった）。

実施例5 - アスコルビン酸およびTGF-βによるBHK細胞増殖の阻害

CNTFを分泌するBHK細胞をDMEM（高グルコース）培地中で増殖させた。サブコンフルエントなBHK培養物をTGF-β1 (2.5ng/ml) およびアスコルビン酸 (100μM) で処理すると、有糸分裂が減少した。さらに、細胞は伸長し、いくつかの細胞は整列した様相を示した。このデータは、TGF-βおよびアスコルビン酸がBHK細胞の増殖を阻害し、分化を誘導することを示唆する。

さらなる実験において、hNGFを分泌するBHK細胞を、BAO中にカプセル化して移植する前に、2.5ng/mlのTGFβ および 100μMのアスコルビン酸で処理した。未処理細胞をコントロールとして供した。特定の変数として、a) TGFβ/アスコルビン酸、Vitorogen™なし、b) TGFβ/アスコルビン酸、Vitorogen™、c) TGFβ/アスコルビン酸なし、Vitorogen™、およびd) TGFβ/アスコルビン酸なし、Vitorogen™なし、が挙げられる。さらに、いくつかの異なるポリマーを用いた。カプセルを成熟ラットの線条体に移植した。ラットを3ヶ月後に屠殺した。

実施例6 - EGF存在下での神経幹細胞の増殖およびEGF非存在下での分化

ニューロスフェアを、Weissら、PCT/CA 92/00283の方法を用いて調製した。68
継代目のニューロスフェアを回収し、2つに分けた。半分のニューロスフェアを

単一細胞の培養物に細かく砕き、そして半分をそのままクラスターとして残した。
。単一細胞の懸濁物において単一細胞の計数を行い、そしてクラスター形成細胞
は同密度であると推測した。同量のVitorogen™、および20ng/ml EGFをコントロ
ールとして含有するニューロスフェア培地またはPC-1培地のいずれかで単一細胞
およびクラスターを別々に懸濁した。

細胞を25,000細胞/ μ lの密度で、実質的に、実施例2に記述のように調製した
1重膜中空ファイバーPAN/PVC BAO中に充填し、次いでハブ(hub)をシールした
。BAOを、EGFを含有するニューロスフェア培地またはPC-1培地(EGFなし)のい
ずれかで保持した。

BAOを3日後および7日後に屠殺し、そして免疫細胞化学によりグリア纖維酸
性タンパク質(GFAP)について染色した。GFAPは星状膠細胞で特異的に発現する
中間フィラメントタンパク質である。GFAP反応性は、神経幹細胞が星状膠細胞に
分化したことを示す。以下の結果が観察された。

| | 期間(日) | GFAP反応性 |
|---------------|-------|-------------|
| 単一細胞、EGFなし | 3 | GFAPに対して少量% |
| 単一細胞、EGF | 3 | 陰性 |
| 細胞クラスター、EGFなし | 3 | GFAPに対して少量% |
| 細胞クラスター、EGF | 3 | 陰性 |
| 単一細胞、EGFなし | 7 | GFAPに対して強く |
| 単一細胞、EGF | 7 | 陰性 |
| 細胞クラスター、EGFなし | 7 | GFAPに対して強く |
| 細胞クラスター、EGF | 7 | 陰性 |

7日目までに、カプセル化された神経幹細胞はEGF非存在下で星状膠細胞に分
化した。

実施例7 - BHK細胞におけるECMの効果

無細胞ECMの調製

15日目の胎児ラットから得られたE15ラット髄膜細胞をマルチウェルプレート

に播種し、そしてコンフルエントにさせた。2週間後、細胞は収縮した单層であり、再増殖させた。

無細胞ECMを、0.1% Triton X-100界面活性剤で30分間処理し、次いで5 mM NH₄OHで3分間の処理することにより、抽出した。

BHK-hNGF細胞

NGFを分泌するBHK細胞株を以下のように作成した。第1イントロンの3'末端の約37bp、プレプロNGFのタンパク質翻訳開始であると考えられる2重のATG配列および完全なコード配列ならびにヒトNGF遺伝子の3'非翻訳領域の全てを含有する2.51 kbのフラグメント（Hoyleら、Neuron, 10, 1019-34頁(1993)）を、DHFRをベースにしたpNUT発現ベクター中に、マウスマクロチオネイン1プロモーター（-650から+7）およびラットインスリンII遺伝子の第1イントロン（Baetgeら、Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5454-58頁(1986)）のすぐ下流にサブクローニングした。

ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞を、カルシウムリン酸法を用いてpNUT-βNGF構築物でトランスフェクトした。BHK細胞を、10%ウシ胎児血清、1×ペニシリントレプトマイシン/アンピシリンB（0.8g/l）、およびL-グルタミン（GIBCO）を含有するDMEM中で5%CO₂、37°Cで増殖させた。トランスフェクトBHK細胞を200 μMのメトトレキセート（Sigma）を含有する培地内で3-4週間選抜し、そして耐性細胞を200 μMのメトトレキセートを伴うかまたは伴わないで、ポリクローナルな集団として維持した。

形質転換BHK-hNGF細胞を、髄膜細胞から抽出したECMを含有するプレート内に1.0×10⁴細胞/ウェルの密度で播種した。また、BHK-hNGF細胞を、ECMを含有しないコントロールプレートに同密度で播種した。細胞を6分割（DIV）後に血球計算機を用いて計数した。

コントロールウェルの細胞数は平均4.5×10⁶ +/- 4.5×10⁵細胞であった。抽出ECMプレートの細胞数は平均9.9×10⁵ +/- 4.9×10⁵細胞であった。これらの結果は、処理プレートでは細胞増殖が4.5倍減少していることを示している。

実施例8 - 内部支持体上の無細胞ECMへの細胞の接着

さらなる実験において、初代髄膜細胞をTECOTTMポリウレタン繊維上に播種した。このような繊維はBAOの内部支持体として有用である。10%FBSを補充したDMEM培地を培養培地として用いた。2週間後、繊維を0.1% Triton X-100で30分間、続いて25mM NH₄OHで3分間処理して抽出した。繊維上の無細胞ECMの存在を確認するため、いくつかの繊維を抗フィプロネクチン抗体を用いて免疫染色した。他の繊維は、BHK細胞を用いた細胞接着アッセイに用いた。

実施例9 - PEO-PDMSで改変されたBAO中にカプセル化されたマイクロキャリア上でのBHK細胞の増殖

PEO-PDMS誘導体化したBAOの調製

実施例2で記述したように1重膜PAN/PVC中空ファイバーBAOを調製した。これらのBAOは、内径642.6±36.7μm、外径787.8±32.2μm、壁厚67.8±16.2μm、BS A拒絶係数 (rejection coefficient) 100%、水力学的透過性約21.8 ml/min/m²/mmHgであった。

PAN/PVC BAOを、無菌条件下でPEO-PDMSを用いて誘導体化した。PEO-PDMS (Hu1s, PS073, 分子量3126 g/モル；重量で82% PEO) の1%または5% (v/v) 溶液を、1mlまたは5mlのPEO-PDMSを100mlの脱イオン水で希釈することにより調製した。この溶液を、「ウエットな」PAN/PVC膜中に注入する前に、無菌沪過 (0.2μm) した。膜をヒートピンチし、水性溶液に浸した。72時間後、細胞を用いて使用する前に、ファイバーをハンクス平衡塩類溶液で洗浄した。

実施例7に記述したように、NGFを分泌するBHK細胞を、PEO-PDMS改変ファイバーの中に以下のように充填した。

充填およびシーリング手順

90%コンフルエントまで増殖したNGF産生BHKの単一細胞懸濁液を、PBS (カルシウムおよびマグネシウムを除いた) で洗浄し、約1分間トリプシン処理し、そして1000rpmで3分間の遠心分離によりペレットにした。細胞を最終細胞密度が2×10⁷細胞/mlになるように培地中に再懸濁した。

細胞を直接PEO-PDMS改変ファイバーに充填するか、または0.15% Vitrogen[®]マ

トリックス溶液もしくは0.5%アガロース溶液と混合し、次いで充填した。約2.5マイクロリットル(μ l)の細胞または細胞/マトリックススラリー(10,000細胞/ μ l)を、各ファイバー中に24ゲージの斜角のカテーテルチップ(tip)およびハミルトン(Hamilton)シリソジを用いて充填した。

デバイスの管腔中に注入するために、細胞を充填するための入り口を有する最も近い端で、隔壁部品(septal fixture)でハブ上へ1-1.1 cm長の乾燥した中空ファイバーを固定することによりカプセルをシールした。2.5 μ lの細胞懸濁液注入後、隔壁を破り、入口の穴をわずかに光硬化したアクリレート(LuxtrakTMLCM 24, ICI Resins US, Wilmington, MA)を用いてシールした(「ハブ」シールした)。続いて、アクリルのハブの上に1.5cm 0.020"のシラスティック(silastic)な管を置くことにより、カプセルを「つなぎ留めた」。

この様式で以下のBAOを調製した。

1. コントロールの非修飾被覆物(jacket)、マトリックスなし;
2. コントロールの非修飾被覆物、Vitrogen[®]マトリックス;
3. コントロールの非修飾被覆物、アガロースマトリックス;
4. 1% PEO-PDMS修飾被覆物、マトリックスなし;
5. 1% PEO-PDMS修飾被覆物、Vitrogen[®]マトリックス;
6. 1% PEO-PDMS修飾被覆物、アガロースマトリックス;
7. 5% PEO-PDMS修飾被覆物、マトリックスなし;
8. 5% PEO-PDMS修飾被覆物、Vitrogen[®]マトリックス;
9. 5% PEO-PDMS修飾被覆物、アガロースマトリックス;

BAOをカプセル化後4日間空気中のO₂で維持し、次いで研究の継続期間中低いO₂レベル(50mmHg)で維持した。図2は、4、11、25日後のNGF分泌(ELISAにより測定)を示す。

NGF放出データは、マトリックス単独では細胞の産出物にほとんど影響を及ぼさないことを示す。しかしながら、PEO-PDMSの存在下で、NGF放出は、アガロースと共に用いた場合およびマトリックスがない場合、実質上低いが、VitrogenTMと共に用いた場合は影響を受けない。さらに、修飾において使用されたPEO-PDMS

の割合は、明らかにNGF放出に対してほとんど影響を及ぼさなかった。組織学のデータから、アガロースでカプセル化されたBHK細胞は伸張した形態を有し、そしてデバイスの壁に並んだ；しかしながら、アガロースそのものの中での生存細胞は非常に少なかった。PEO-PDMS修飾ファイバー内にアガロースと共に充填されたBHK細胞はまた、カプセルの内部管表面に並んだが、球状の形態を有していた。PEO-PDMS-PAN/PVC修飾ファイバー中の細胞はアガロースを用いた非修飾ファイバー中の細胞よりも少なく、このことは、細胞増殖が制御されたことを示した。VitrogenTMを充填したデバイス中の細胞はファイバーの修飾によって影響を受けず、また、マトリックスを用いないでカプセル化した細胞も影響を受けなかった。

VitrogenTMマトリックスを用いた非修飾ファイバー中のBHK細胞は、約75%の生存性で十分に分布していた。デバイスの中心にいくつかの細胞壊死が存在した。PEO-PDMS修飾は、細胞分布、生存性または形態に影響を及ぼさなかった。マトリックスとしてのアガロースの場合、細胞分布は約90%の細胞生存性と共に優れていた。アガローススマトリックスを用いた場合、BHKの細胞形態はPEO-PDMS修飾の膜（1%および5%）によって影響を受けた。細胞は、非修飾のP(AN/VC)中で伸張し、そして修飾P(AN/VC)中でより丸くなかった。細胞は、アガローススマトリックス中に位置しないが、ファイバーとアガロースの「棒（rod）」との間の空間に位置した。マトリックスがない場合、細胞は大きなクラスターを形成し、そして生存性が（約）60%と低いため、細胞分布はより不十分である。

実施例10—CultiSphersTMにおけるBHK細胞増殖

実施例7で述べたNGF分泌BHK細胞を、コラーゲンでコーティングしたCultiSphersTM上で生育させた。CultiSphersTM(1g)を、50mLのPBS(CMF)中で再水和させた。15×10⁶個の細胞を、1mLの再水和したCultiSphersTM中に懸濁した。細胞/CultiSphersTM懸濁液を1重膜PAN/PVC中空ファイバーに直接ロードするか、または1:1の割合で1%アガロースと混合し、次いで1重膜PAN/PVC中空ファイバーにロードした。実質的に実施例2に述べたようにファイバーを調製し、実質的に実施例9に述べたようにロードし、そしてシールした。

カプセル化した細胞を2日、15日、および56日目に、ELISAによりNGF分泌につ

いてテストした。培地を1週当たり3回補充した。図3は結果を示す。NGF放出データは、BHK細胞が、BAO中にカプセル化された場合にCultiSphersTMマイクロキャリア上で増殖し得ることを示す(図3、凡例:n-mat-008、0709-n-m)。さらに、NGF放出データは、BHK細胞/CultiSphersTMが、NGF分泌にほとんどまたは全く影響を与えることなく、アガローススマトリックス中でさらに懸濁され得ることを示す(図3、凡例:agaro-008、agaro-0709)。

実施例11—細胞数および細胞分布を制御するためのペプチド誘導体の使用

本実施例において、BAOの管腔表面をPEO-PDMS、ポリ(d-リジン)、または市販の細胞接着性タンパク質であるPepTite 2000TMで修飾した。

この研究において、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞を用いた。なぜなら、これらは足場依存性細胞であり、そして中空ファイバー膜に接着することがこれまでに知られているからである。

ファイバー

1重膜PAN/PVC BAOを、実質的に実施例2に述べたように生成した。ファイバーの寸法は内径625 μ mであり、壁厚は50 μ mである。これらのファイバーを、70%エタノール中に一晩浸漬することにより滅菌し、次いでHBSSで繰り返しリシスした。

誘導体化

1. PDMS-PEO: BAOを、以下のようにしてPDMS-PEOで誘導体化した。PEO-PDMSの1%(V/V)溶液(Hu1sより購入、PS073、Mw=3126 g/モル；82重量%PEO)を、1mlのPEO-PDMSを脱イオン水で100mlまで希釈することにより調製した。溶液を、滅菌膜に注入する前に滅菌沪過(0.2 μ m)した。膜を室温で24時間、1%PEO-PDMS水溶液中に浸漬した。ファイバーを水でリシスし(3回)、次いで細胞に注入する前にHBSSでリシスした。

2. PdL: BAOを、以下のようにしてポリ(d-リジン)で誘導体化した。ファイバーを分子量67,000のポリ(d-リジン)2mg/mlの水溶液中で、室温で24時間浸漬し

た。ファイバーを3回水でリシスし、次いで細胞に注入する前にHBSSで3回リシスした。

3. PepTite 2000TM:BAOを、以下のようにしてPepTite 2000TMで誘導体化した。ファイバーを、既にエタノール中に溶解した100mg/mlのPepTite 2000TMのPBS溶液中に浸漬した。ファイバーをこの溶液に室温で24時間浸漬し、次いで細胞に注入する前にPBSで3回リヌスした。

4. PAN/PVC:コントロールファイバーを、細胞に注入する前に室温で24時間HBSS中に浸漬した。

細胞

BHK細胞を、濃度5000細胞/ μ lで、誘導ファイバーにロードした。ファイバーをシールし、無血清培地(PC1培地)を含むネジで封をしたチューブ内に載置し、次いで37°Cに設定されたインキュベーター内で最高2週間、回転ドラム上に載置した。ドラムの速度は、2 rpmであった。適切なときに、ファイバーを、4%パラホルムアミド中で固定し、段階的に変化させた(graded)エタノール中で脱水し、そして四酸化オスミウムによる細胞分布の組織学的分析のためにヘマトキシリントマス(HE)で染色した。

PAN/PVC誘導体化膜は、四酸化オスミウム染色により判定されるように、ポリ(d-リジン)で誘導体化されたときに良好な細胞分布を示し、そしてPepTiteTM 200で誘導されたときに、より均一な細胞分布を示した。

PAN/PVC膜に対して、PepTite 2000TMによる修飾を2つの方法で試みた。第1の方法では、膜の管腔内表面のみを修飾し、第2の方法では、管腔内表面と外表面との両方を処理した。空の(すなわち、細胞を含有しない)BAOを全アミノ酸に関して分析し、それによりポリ(d-リジン)またはPepTite 2000TMの結合を決定した。コントロールの非修飾膜に結合した全アミノ酸は、約0.2 μ g/BAOであった。ポリ(d-リジン)-修飾膜に結合した全アミノ酸は、修飾管腔内表面膜の場合約0.8 μ g/BAOであり、管腔内表面と外表面とを修飾した場合約2.6 μ g/BAOであった。BHK細胞をロードした同様のBAOを14日間維持し、次いで組織学的に調べた。コントロール非修飾BAOにおいては、細胞がファイバーの全長にわたって大きなクラスターで不均一に位置づけられていた。対照的に、両タイプの修飾ファイバーに

おいては、細胞が膜の管腔表面に沿って均一に分布されていた。

これらの結果は、ポリ(d-リジン)およびPepTite 2000TMがBAOの管腔表面に対する細胞の接着を促進させるために効果的であり、従ってBAO中における細胞分布を制御するために効果的であることを示唆する。

実施例12—ニューロスフェアの成長を制御するためのECM分子の使用

継代71マウスニューロスフェアを、実質的に実施例1に述べたように調製した。多重ウェル皿を0.5%アガロース(Sea-PrepTM)で予めコーティングすることにより、ニューロスフェアがプラスチック皿に接着することを防止した。細胞を、1ウェル当たり約50,000細胞の密度で実験用に指定されたマトリックスに播種した。各マトリックス条件につき3つのウェルを用いた。ウェルのうち2つは、PC-1培地(コントロール)を含み、1つはニューロスフェア+EGF培地(EGF)を含んでいた。

皮膚由来1型コラーゲン(ZydastTM; Collagen Biomedical, Palo Alto)、腱由来1型コラーゲン(OrganogenesisTM)、1型コラーゲン(VitrogenTM、Celltrix, Santa Clara)、およびアガロースを、単独で、あるいは、ラミニンまたはPepTite 2000TMと組み合わせて、または両方と組み合わせて、細胞増殖を制御する際の有効性に関して評価した。

4日目および14日目に、フルオレセインジアセテート/ヨウ化プロビジウム(FD A/PI)で染色することにより細胞をアッセイし、細胞の生存可能性、増殖、および分化に関して評価した。OrganogenesisTMコラーゲン、PepTite 2000TM、およびラミニンの組み合わせに曝された細胞が、最大量の分化を示し、細胞の約90%が分化した。アガロース、PepTite 2000TM、およびラミニンの組み合わせに曝された細胞の約80%が分化した。

実施例13—BAO中のBHK細胞数および細胞分布を制御するための不活性骨格の使用

2つのタイプのPAN/PVCファイバー(実質的に実施例2に記載)、すなわち、外表面上に選択透過膜を有する1重膜ファイバーと内表面上に選択透過膜を有する

1重膜ファイバーとを用いた。

まず、PAN/PVCファイバーを脱グリセリン化し、70%滅菌済エタノールに一晩浸漬することにより滅菌した。次いで、ファイバーを約1～2時間の間にわたって滅菌水で3回リシスした。

次に、1.5gのPHEMAを、10mlの95%エタノール(190ブルーフ、Quantum)に溶解することにより、濃度15%のポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)("PHEMA")骨格マトリックスを調製した。さらに、1.0gのPHEMA/MMAを10mlの95%エタノールに溶解することにより、濃度10%のポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート-コ-メチルメタクリレート)("PHEMA/MMA")骨格マトリックスを作製した。ポリマーをより容易に溶解するために、溶液を攪拌し加熱した。

PHEMAまたはPHEMA/MMA溶液を、PAN/PVCファイバー中に注射器でロードし、次いでPAN/PVCファイバーを滅菌水中に浸漬した。ロードされたファイバーを1時間より長く水中に放置することにより、骨格が沈澱すること、およびエタノールがコアから拡散することを確認した。ファイバーの端部を切り取った。なぜなら、端部はPHEMAまたはPHEMA/MMAのいずれかで詰まることが多いからである。ファイバーを、滅菌HBSSを含むペトリ皿に移した。このようにして、PHEMA、PHEMA/MMAをロードしたBAO、およびコントロールのBAOを調製した。

NGF分泌BHK細胞(実施例7に記載)を、グルタミンおよび抗生物質を添加した10%DMEM中で増殖させた。細胞を、0.25%トリプシンでフラスコから穏やかに引き出し、洗浄して、PC1培地で 1×10^7 細胞/mlの密度まで再懸濁した。

22ゲージテフロン製カテーテルを用いて、BHK-NGF細胞を10,000細胞/ μ lの密度でファイバーにロードした。ヒートピンチングによりBAOをシールした。

各タイプにつき5つのBAOを調製した。4つを、1mlのPC-1培地を含む24ウェルプレート内に載置した。第5のBAOは、約3～4mlの垂直チューブ中のPC-1培地中に載置した。24時間後、垂直チューブ中に載置されたBAOを管腔に沿って(長手方向断面)開き、フルオレセインジアセテート/ヨウ化プロビジウム(FDA/PI)で染色することにより、ファイバー内の細胞分布について24時間後分析した。蛍光顕微鏡下で観察すると、FDAは、生存する細胞を緑色に染色し、PIは生存していない細胞を赤色に染色する。

残りのBAOを2週間培養した。BAOをカプセル化後4日間 O_2 雰囲気に維持し、次いで研究の期間中、低い O_2 レベル(50mMg)に維持した。

4日、7日、および14日後にNGF分泌を(ELISAにより)測定することにより、BH-K-NGF細胞の機能性をテストした。細胞PHEMAまたはPHEMA/MMA骨格含有BAOは、研究の期間中、NGFを分泌し続けた。組織学とNGF放出データの両方が、PHEMAおよびPHEMA-MMA骨格がBAOに沿って分布する機能的活性な生存細胞の維持を可能にすることを示している。10%PHEMA-MMA骨格による結果が最良であった。

実施例14—BAO中のPC12A細胞数および細胞分布を制御するための不活性骨格の使用

PHEMAおよびPHEMA/MMA不活性骨格の有効性を、BAO中のPC12の分布を制御することにおける有効性について評価した。

1重膜ファイバーを、実質的に実施例2に述べたように調製した。これらのファイバーは代表的には以下の特徴を有していた: 内径642 μ m、外径787 μ m、壁厚68 μ m、拒絶係数100%(BSA)、水力学的透過率22ml/分/m²/mmHg。

PHEMAおよびPHEMA/MMAの不活性骨格を、実質的に実施例13に述べたように、これらのファイバー中に調製した。

HL-1培地中のPC12A細胞(1×10⁷細胞/ml)をファイバーの管腔に注入し、そしてファイバーを加熱シールして長さ約1cmのBAOを作製した。デバイスを、HL-1培地中において37°Cにて大気圧に保持した。カプセル化された細胞の機能性を評価するために、1日目、14日目、および28日目に、BAOを、基底カテコールアミン放出およびK⁺誘発カテコールアミン放出についてテストした。結果を、図4Aおよび図5A(基底放出)ならびに図4Bおよび図5B(K⁺誘発放出)に示す。これらの結果は、不活性PHEMAおよびPHEMA/MMA骨格を有するBAO内にカプセル化されたPC12細胞が、カテコールアミン放出により測定されるように、その機能性を保持していることを示す。

5時間後および4日後に、ファイバーを垂直に半分に切断し、そして細胞をFDA/PIで染色することにより、BAO中の細胞分布を評価した。これらの結果は、PHEMAおよびPHEMA/MMA骨格が非毒性であり、そしてPC12細胞の細胞生存性と機能性

とを支持することを示した。

実施例15-BAO中の細胞接着および分化を促進するためのNWPFの使用

6つのタイプのNWPF(Reemay, Tennessee)、すなわち、#2470、#2295、#2024、#2055、#2033、#2250(Reemay #)を試した。受け取ったファブリックはフラットシート形態であった：ディスクをパンチアウトして24ウェルプレートに適合させた。NWPFディスクを1%(w/v)硫酸ドデシルナトリウム(SDS)中に6時間浸漬し、次いで水でリーンス(3回)した。その後、ディスクを1%硫酸(H₂O中でv/v)に13時間(一晩)浸漬し、次いで水で3回リーンスした。ディスクをペーパータオル上で乾燥させ、次いでオートクレーブすることにより滅菌した。

細胞接着についてテストするために、ディスクで3つのタイプの細胞、すなわち、BHK、AT-3、およびTSA細胞を培養した。約100,000個の細胞を、PC1培地中に、上記の6つのNWPFディスクのうちの1つを含む24ウェルプレートに添加した。血清の干渉なしに細胞接着についてテストするために、無血清培地を用いた(TSA細胞を除く)。4日後、BHKおよびAT-3細胞を、PDA/PIによる接着に関して調べた。細胞は、細長い形態を有し、そしてReemay #2250および2055上に接着しているように見えた。10日目、BHKは#2250上で最もよく増殖していた。AT-3細胞は、2024および2295に最もよく接着した。10日目、AT-3細胞は2024上で最も良く増殖した。1日後、TSA細胞(10%FCS中)は、#2250、#2055上で増殖した場合、細長い形態を有し、そして#2024上で最もよく増殖した。7日目、TSA細胞は、#2055上で最もよく増殖していた。

実施例16-マトリックス物質中に懸濁されたマイクロキャリア上のSV40/D β H-NGF細胞

トランスジェニックマウスにおいてSV40 T-抗原(tsa58)(D β H-SV)とヒト成長因子(D β H-hNGF)との同時発現を導くために、ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(D β H)遺伝子の調節エレメント(Hoyleら、*J. Neurosci.*, 14, pp.2455-63(1994))を用いた。キメラ遺伝子の同時発現は、副腎髓質およびノルアドレナリン性交感神経節において新生物を生じた。これらのマウスのうちの一匹に由来する腹腔領域の腫瘍を摘出し、そして腫瘍組織を機械的に解離しそして細胞培養(DMEM、10%

FBS、37°C、5%CO₂)中に載置した。2つの異なる細胞タイプ、すなわち大きい平坦な線維芽様細胞、および伸長ニューライト突起(neurite processes)を有する小さいフェーズブライト(phase-bright)細胞が、初期培養期間から存在していた。小さい細胞は、ニューロフィラメントⅠおよびニューロフィラメントMならびにチロシンヒドロキシラーゼに対する免疫反応性を含むカテコールアミン性ニューロンの特徴を示した。SV-40 T抗原に対する免疫反応性もまた、これらの細胞に存在した。対照的に、線維芽様細胞は、これらのマーカーに対してネガティブであった。細胞を毎週継代した。

細胞を、実施例10に述べたようにCultiSphersTM上で生育させ、そしてアルギネート(1.5%)またはアガロース(1%)マトリックスのいずれかに懸濁した。アルギネートマトリックスの場合、デバイスをカプセル化後5分間1%塩化カルシウム水溶液中に浸漬することにより、アルギネートを架橋した。細胞/CultiSphersTM/マトリックスを、実施例10に述べたように、PAN/PVC中空ファイバーにロードした。

細胞をロードしたBAOを、無血清培地条件で維持した。HBSS中の30分間のインキュベーションの前に、デバイスを選択された時間間隔で洗浄した。基礎培地を回収し、そしてHPLC-EDによりL-ドーパについてアッセイした。80日目、デバイスはインビトロでL-ドーパを分泌し続けていた。

実施例17-遺伝的改変筋芽細胞は分化後NGFを分泌する。

マウスC₂C₁₂筋芽細胞は、急速に分裂する細胞であるという利点を有し、インビトロで大量に増殖され得、タンパク質を発現するように移され得、そして選択されたクローンは単離され得る。マウスC₂C₁₂細胞は、低血清含有培地に曝されると有糸分裂後の状態に分化され得る。従って、これらの細胞は、増殖が制御され得ない分裂細胞に比較して、カプセル化にとって都合がよい。増殖が制御され得ない分裂細胞は、カプセルに充満するまで分裂し続け、そしてデブリの蓄積が数カ月後に観察される。

本発明者らは、トランスフェクトC₂C₁₂筋芽株が、筋管への融合が起こった後に

hNGFを分泌し続ける能力をテストした。

Lipofectamine試薬を用いて製造者のプロトコル(Gibco)に従って、C₂C₁₂筋芽細胞(ATCC)を、hNGF遺伝子でトランスフェクトした。細胞を、1mg G418中で2週間選択し、次いでNGF産生量についてテストした。細胞を、カバースリップを用いてまたは用いずに、T75フラスコおよび24ウェルプレートに約260細胞/cm²で播種した。1週当たり2回、細胞にDMEMおよび10%FBSを与えた。1日目、5日目、8日目、および13日目に、細胞を回収し、その時点でのNGF分泌を測定した。結果を表2に示す。

表2: NGF分泌についてのC₂C₁₂スクリーニングの時間経過

| 細胞株 | 培養 | 集密度 | 融合 | NGF |
|------|------------------|------|----|--------|
| 分泌 | 時間 | % | % | |
| 親 | 1日目 (3/23/95) | 25 | 0 | nt |
| +NGF | 1日目 (3/23/95) | 25 | 0 | nt |
| 親 | 5日目 | 40 | 0 | nt |
| +NGF | 5日目 | 30 | 0 | nt |
| 親 | 8日目 | 98 | 5 | *** |
| +NGF | 8日目 | 90 | 1 | 0.0018 |
| 親 | 13日目 | 1000 | 80 | ND |
| +NGF | 13日目 | 100 | 50 | 0.014 |

融合% = 筋管中に形成された筋芽細胞%

「+NGF」は、hNGF遺伝子でトランスフェクトされたC₂C₁₂細胞を示す。

「親」は、トランスフェクトされていないC₂C₁₂細胞を示す。

NGF分泌は、pg/ml/細胞/24時間で測定した。

nt = テストせず。

ND = 検出されず。

*8日目 細胞はサイズが増加し、融合の準備ができた。

*8日目 Tフラスコ内よりも培養皿中の方が融合が多かった(フローサイメトリーはフラスコに対して行われた。)

これらの結果は、トランスフェクト筋芽細胞が、最終的に筋管に分化した後に所望の異種産物、すなわち、NGFを分泌し続けることを示唆する。

実施例18—遺伝的改変筋芽細胞は分化後CNTFを分泌する。

本発明者らは、マウスC₂C₁₂筋芽細胞を、ヒトCNTF遺伝子を含むpNUT発現ベクター(Baetgeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83、pp. 5454-58(1986))でトランス

フェクトした。hCNTF遺伝子の発現レベルおよび因子の生物活性を、胚脊髄運動ニューロン培養物についてノーザンプロット、ELISAアッセイ、およびChAT活性により分析した。1つのC₂C₁₂クローニングが約0.2g CNTF/10細胞/日を分泌することが判明した。hCNTFの分泌速度は、C₂C₁₂筋芽細胞の分化の際変化しなかった。最終的に、C₂C₁₂-hCNTFは、軸索切断誘導細胞死から運動ニューロンを救出し得た。新生ラットの顔面神経核の形態学的研究は、軸索切断の1週間後、コントロール動物においては顔面運動ニューロンの13.4%のみが保持されたが、他方、hCNTFの連続放出は、運動ニューロンの22.7%の生存を生じたことを示した。

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：サイトセラピューティクス、インコーポレイテッド

(ii) 発明の名称：生体人工臓器にカプセル化される細胞のための増殖制御の方法および組成物

(iii) 配列数：4

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：ジェームス エフ. ハーレー, ジュニア,
フィッシュ アンド ニープ

(B) 番地：1251 アベニュー オブ ザ アメリカズ

(C) 市：ニューヨーク

(D) 州：ニューヨーク

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：10020-1104

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(vii) 先願データ：

(A) 出願番号：US 08/279,773

(B) 出願日：1994年7月20日

(C) 出願番号：US 08/432,698

(D) 出願日：1995年5月9日

(viii) 代理人／事務所情報：

(A) 氏名：ハーレー ジュニア, ジェームス エフ.

(B) 登録番号：27,794

(C) 照会／記録番号：CTI-22 CIP PCT

(ix)電話回線情報:

- (A)電話:(212) 596-9000
- (B)テレファックス:(212) 596-9090

(2)配列番号1の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 9アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列: 配列番号1:

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Asp | Pro | Gly | Tyr | Ile | Gly | Ser | Arg |
| 1 | | | | | | | | 5 |

(2)配列番号2の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 6アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列: 配列番号2:

| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Gly | Asp | Ser | Pro |
| 1 | | | | | 5 |

(2)配列番号3の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 19アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列: 配列番号3:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Ser | Arg | Ala | Arg | Lys | Gln | Ala | Ala | Ser | Ile | Lys | Val | Ala | Val | Val | Ser |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | 10 | 15 |

Ala Asp Arg

(2)配列番号4の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 5アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

- (ii)配列の種類: ペプチド
- (iii)ハイポセティカル: N0
- (iv)アンチセンス: N0

(xi)配列: 配列番号4:

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

【図1】

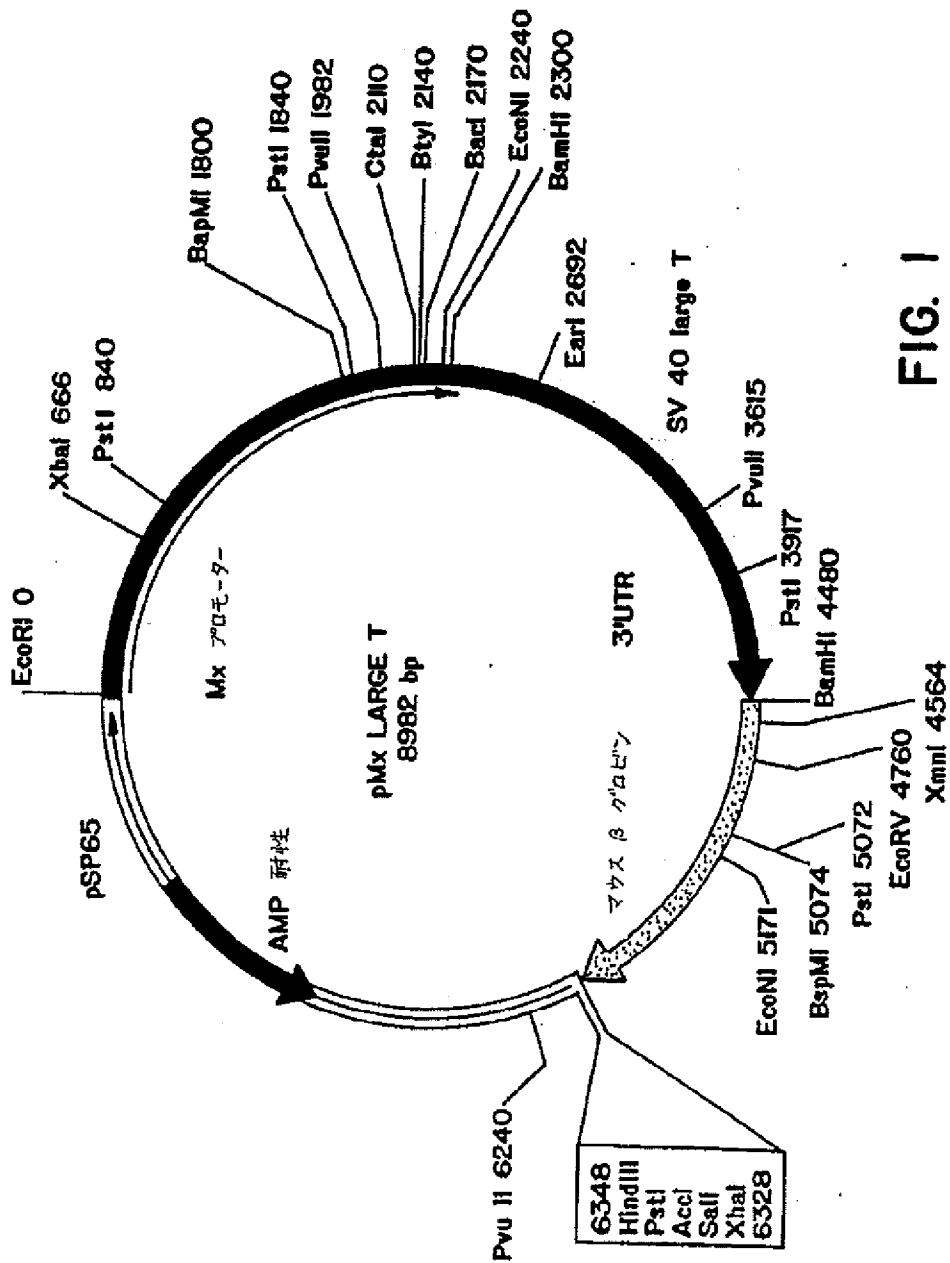


FIG. 1

【図2】

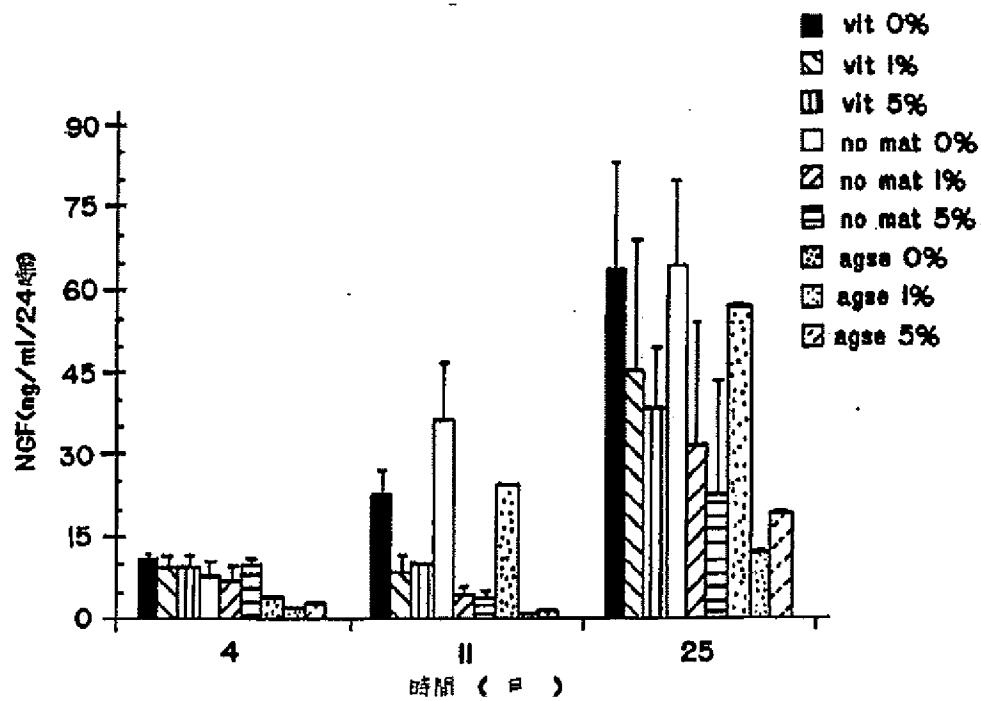


FIG. 2

【図3】

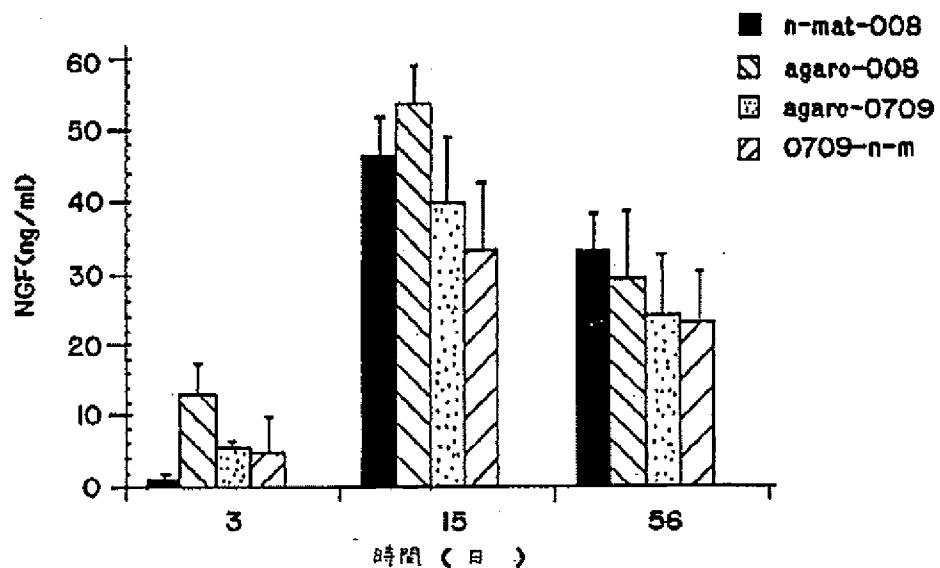


FIG. 3

【図4】

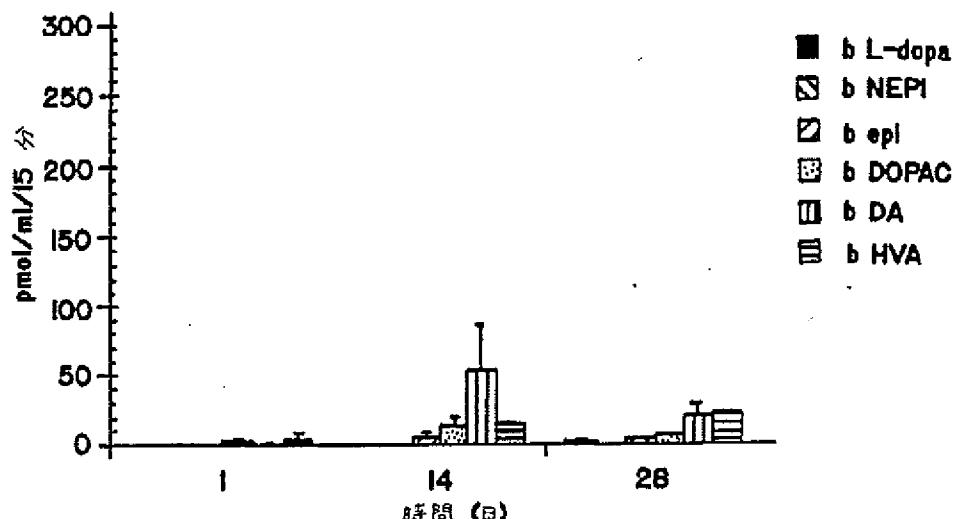


FIG. 4A

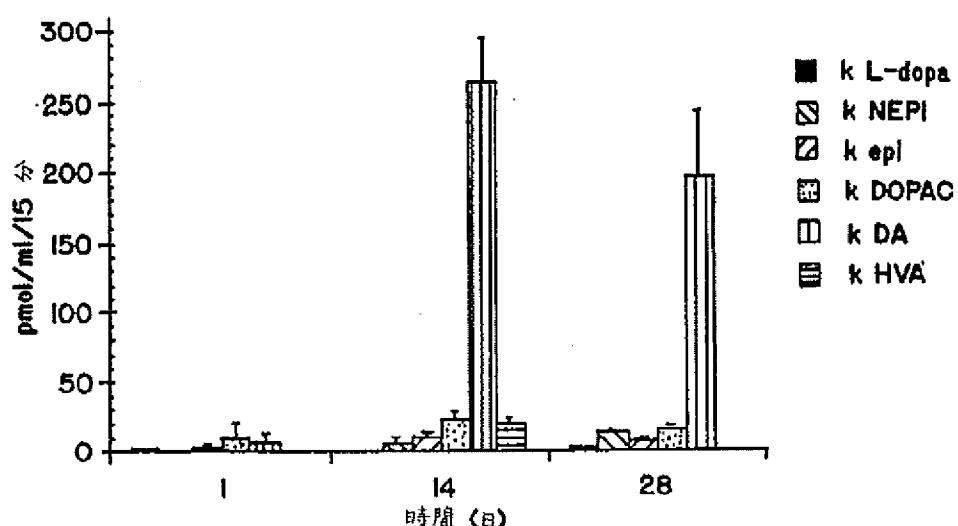


FIG. 4B

【図5】

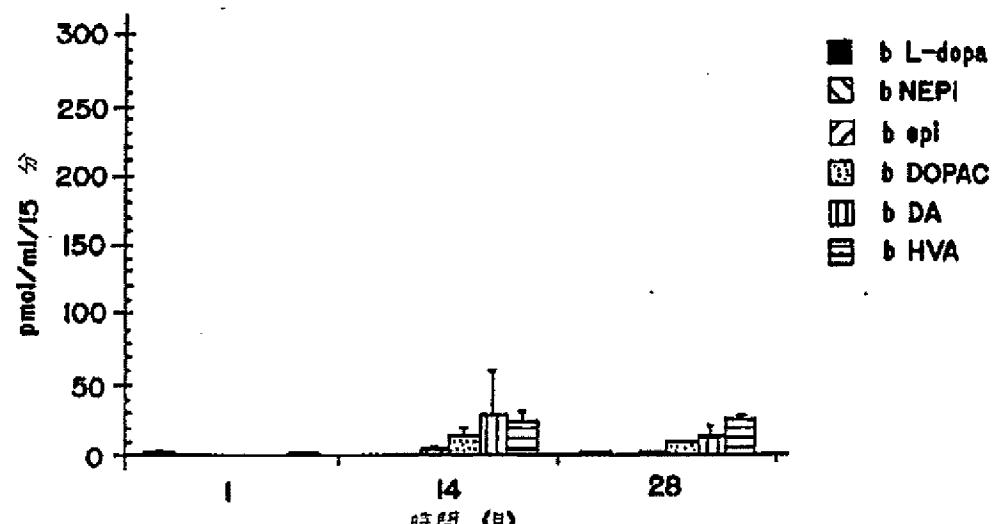


FIG. 5A

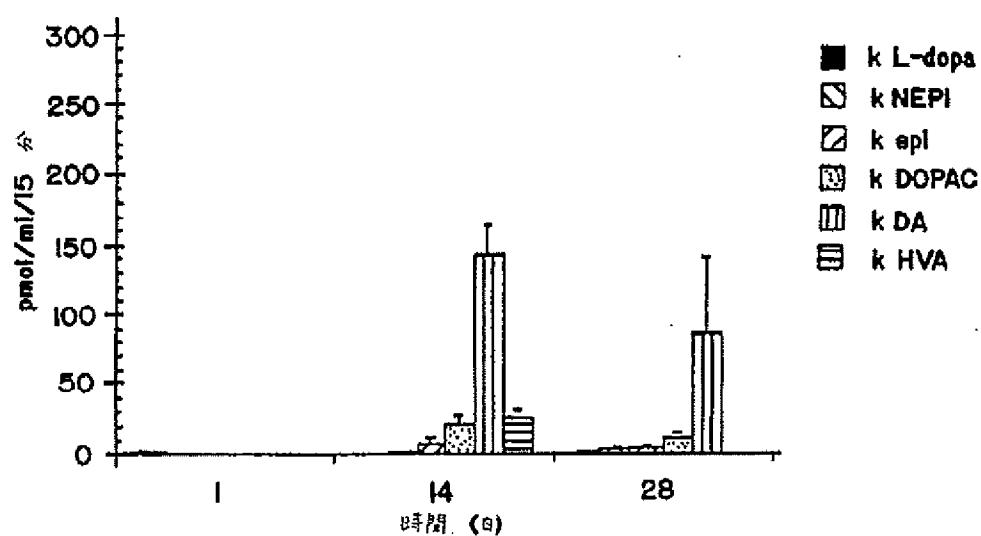


FIG. 5B

【図6】

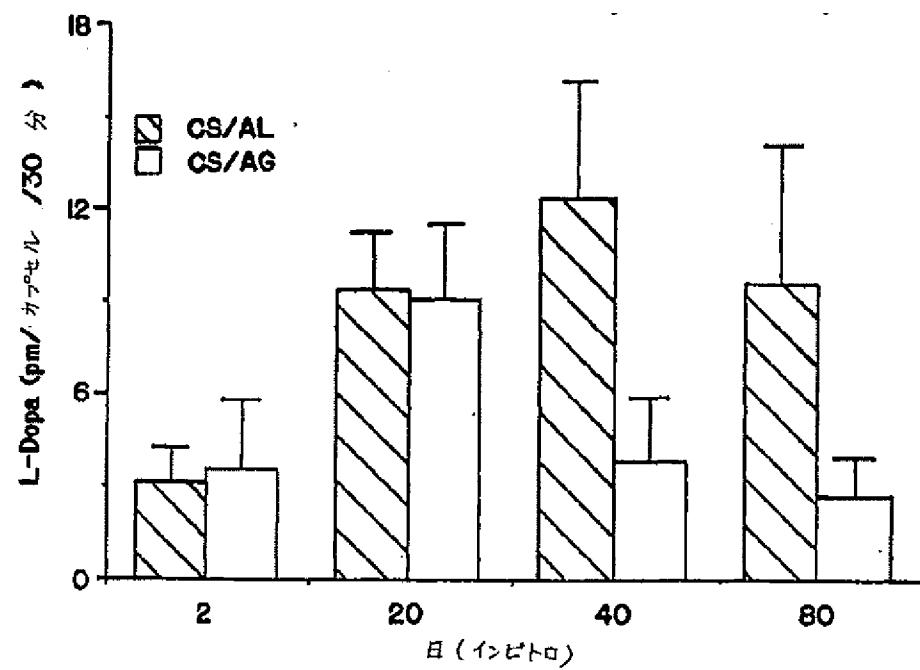


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|--|--|--|
| | | Intern'l Application No PCT/US 95/09281 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/12 C12N5/10 A61K35/12 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K C12N A61K A61L | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO,A,91 09939 (FELDMANN, M. ET AL.) 11 July 1991 see page 3, line 31 - page 4, line 31 see page 5, line 14 - line 18; claims; table 1 --- | 1-4,31 |
| E | WO,A,95 28166 (CYTOTHERAPEUTICS) 26 October 1995 see the whole document --- | 1,31 |
| T | WO,A,94 29442 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 22 December 1994 see claims 1-4,11,24-27,34-41 --- | 1,2,5 |
| Y | WO,A,91 13150 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH & MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 5 September 1991 see claims 1-5,8,12-14,18-20,22-26 --- | 1-4 -/- |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents: | | |
| 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | |
| 'B' earlier document but published on or after the international filing date | | |
| 'C' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | |
| 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | |
| 'E' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| 'F' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | | |
| 'G' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | | |
| 'H' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | | |
| 'I' document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 16 January 1996 | 02.04.96 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentdienst 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | Authorized officer CHAMBONNET, F | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 95/09281

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X | <p>PHYSIOLOGICAL RESEARCH, vol.43, no.2, pages 117 - 120</p> <p>FARGHALI, H. ET AL. 'The concept of application of immobilized and perfused mammalian cells (a bioreactor model) in biomedical research' see the whole document</p> <p>---</p> | 1,31 |
| Y | <p>DE,A,41 23 629 (BODZIONY, J.) 20 February 1992</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p> | 1-4 |
| Y | <p>WO,A,89 09816 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 October 1989</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p> | 1-4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/09281

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(3)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 6 inventions; see cont-sheet PCT/ISA/21D

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

2 and 6; partially: 1 and 31

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US95/09281

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

1. claims 2-6 and (partially) 1,31
2. claims 7,8 and (partially) 1,31
3. claims 9,10 and (partially) 1,31
4. claims 11-23 and (partially) 1,31
5. claims 24-29 and (partially) 1,31
6. claims 30 and (partially) 1,31

1. A method for controlling distribution of cells within a bioartificial organ comprising transforming the cells with a proliferation-promoting gene operatively linked to a regulatable promoter such that expression of the proliferation-promoting gene can be inhibited upon in vivo implantation in a host and the bioartificial organ.
2. A method for controlling distribution of cells within a bioartificial organ comprising transforming the cells with a proliferation-suppressing gene operatively linked to a regulatable promoter such that expression of the proliferation-suppressing gene can occur upon in vivo implantation in a host, but can be inhibited in vitro.
3. A method for controlling distribution of cells within a bioartificial organ comprising transforming the cells with a differentiation-inducing gene operatively linked to a regulatable promoter such that expression of the differentiation-inducing gene can occur in vivo implantation in a host, but can be inhibited in vitro and the bioartificial organ.
4. A method for controlling distribution of cells with a bioartificial organ comprising exposing the cells to a proliferation-inhibiting compound or to a differentiation-inducing compound and the bioartificial organ.
5. A method for controlling distribution of cells within a bioartificial organ comprising exposing at least one growth surface within the bioartificial organ to a treatment that promotes or inhibits cell attachment thereto and the bioartificial organ.
6. A method for controlling distribution of cells within a bioartificial organ comprising exposing the cells to a proliferation-inhibiting dose of UV radiation and the bioartificial organ.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern'l Application No
PCT/US 95/09281

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|----------|------------------|
| WO-A-9109939 | 11-07-91 | AU-B- | 636434 | 29-04-93 |
| | | AU-B- | 6967891 | 24-07-91 |
| | | CA-A- | 2071998 | 22-06-91 |
| | | EP-A- | 0506756 | 07-10-92 |
| | | JP-T- | 5502377 | 28-04-93 |
| WO-A-9528166 | 26-10-95 | AU-B- | 2382995 | 10-11-95 |
| WO-A-9429442 | 22-12-94 | AU-B- | 7108194 | 03-01-95 |
| | | CA-A- | 2165162 | 22-12-94 |
| WO-A-9113150 | 05-09-91 | AU-B- | 3305395 | 11-01-96 |
| | | AU-B- | 660604 | 06-07-95 |
| | | AU-B- | 7328691 | 18-09-91 |
| | | CA-A- | 2076345 | 21-08-91 |
| | | EP-A- | 0516664 | 09-12-92 |
| | | JP-T- | 5504066 | 01-07-93 |
| DE-A-4123629 | 20-02-92 | NONE | | |
| WO-A-8909816 | 19-10-89 | DE-T- | 68907220 | 27-01-94 |
| | | EP-A,B | 0428519 | 29-05-91 |
| | | JP-T- | 3504799 | 24-10-91 |
| | | US-A- | 5338839 | 16-08-94 |
| | | US-A- | 5270191 | 14-12-93 |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
 NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG,
 CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
 TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG),
 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH,
 CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,
 GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
 KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN,
 MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU,
 SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT,
 UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 ショイチエット, モリー エス.
 カナダ国 オンタリオ エムラエス 1エ
 イ4, トロント, カレッジ ストリ
 ト 200, ルーム 213, ユニバーシテ
 イ オブ トロント、デパートメント オ
 ブ ケミカル エンジニアリング

(72)発明者 ジェンティル, フランク ティー.
 アメリカ合衆国 ロードアイランド
 02888, ウォークィック, ローン ア
 ベニュー 57

(72)発明者 ハマン, ジョセフ ピー.
 アメリカ合衆国 ロードアイランド
 02806, バーリントン, プロスペクト
 ストリート 3

(72)発明者 ホランド, ローラ エム.
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19044,
 ホーシャム, デイビス グローブ ロ
 ード 1009

(72)発明者 ケイン, ブライアン エム.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02149, イブレット, アービング ス
 トリート 48

(72)発明者 ドハーティ, エドワード ジュイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02048, マンズフィールド, ネイサン
 ロード 10

(72)発明者 ワイン, シェリー アール.
 アメリカ合衆国 ロードアイランド
 02917, スミスフィールド, ヘイブン
 ストリート 13

(72)発明者 アエビッシャー, パトリック
 スイス国 シーエイチ-1095 ルトリー,
 チェミン デ プランタス 65

(72)発明者 メシング, アルビー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711,
マディソン, ゴールド ドライブ
2431